

Rec'd PCT/PTO 25 APR 2005
PCT/PTO 03/02339

RC 04.11.2003

REC'D 25 NOV 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

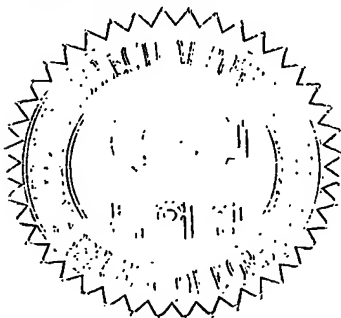
This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0077256
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 11월 03일
Date of Application NOV 03, 2003

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

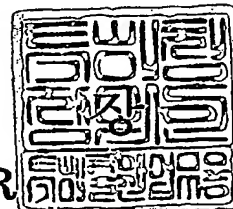
출원인 : 조아제약주식회사 외 1명
Applicant(s) CHO-A PHARM CO., LTD., et al.



2003 년 11 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.11.03
【발명의 명칭】 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용 단백질의 생산 방법
【발명의 영문명칭】 Porcine uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter
【출원인】
 【명칭】 조아제약주식회사
 【출원인코드】 1-1998-100521-4
【출원인】
 【성명】 김진회
 【출원인코드】 4-2002-032316-9
【대리인】
 【명칭】 특허법인다래
 【대리인코드】 9-2003-100021-7
 【지정된변리사】 박승문, 조용식, 윤정열, 김정국, 안소영, 김희근, 권경희
 【포괄위임등록번호】 2003-074626-1
 【포괄위임등록번호】 2003-074151-0
【발명자】
 【성명】 김진회
 【출원인코드】 4-2002-032316-9
【우선권주장】
 【출원국명】 KR
 【출원종류】 특허
 【출원번호】 10-2002-0067856
 【출원일자】 2002.11.04
 【증명서류】 첨부
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
 【기탁기관명】 생명공학연구원 유전자은행
 【수탁번호】 KCTC 10352BP

【수탁일자】 2002.10.17

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 13

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
특허법인다래 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 54 면 54,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 12 항 493,000 원

【합계】 602,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 314,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서[미생물기탁증명서 및 번역문]_1통 3. 중소기업기본법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 높은 효율로 목적단백질의 방광 특이적 발현을 촉진한다.

본 발명의 프로모터를 이용하여 목적단백질을 발현하도록 형질전환된 동물은 소변 중에 목적단백질을 고농도로 분비하며, 이렇게 하여 생산된 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터 및 이를 이용한 유용단백질의 생산 방법 {Porcine uroplakin II promoter and the production method of useful proteins using said promoter}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용된 프로브와, 상기 프로브에 의해 분리된 클론들의 구조를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 3은 돼지 유로플라킨 II mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 4는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광상피 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 5는 돼지 유로플라킨 II 단백질의 방광세포 중 발현을 및 우산세포 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO mRNA의 방광 특이적 발현을 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐에서 EPO 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 구조를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 발현 벡터들의 EPO 유전자 발현량을 비교하여 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명의 발현 벡터들의 EPO 단백질 발현량을 비교하여 나타낸 도이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <13> 본 발명은 돼지의 유로플라킨 II(uroplakin II) 유전자의 프로모터(promoter) 및 이를 이용한 유용단백질의 생산 방법에 관한 것이다.
- <14> 의약 분야에서 경제적 부가가치가 높은 EPO 등의 생산을 극대화하는 방법으로서, 세포배양법에 의한 대량생산방법이 주로 사용되어 왔다. 그러나, 이 방법은 동물의 혈액을 배양 배지로 이용하기 때문에 생산 비용이 높아지고, 배양기술에 있어서 전문적인 지식이 요구된다. 또한 배지성분에 함유된 동물의 EPO와 새로 생산한 EPO를 완전히 분리하는 것이 불가능하기 때문에 최종적으로 얻는 EPO의 순도가 낮고, 활성이 낮다는 문제점이 있다.
- <15> 반면 형질전환동물을 이용한 유용단백질 생산 방법은, 동물이 분비하는 체액 중에 목적단백질이 포함되므로 기존의 세포배양법에 비해 목적단백질의 분리·정제가 용이하며, 활성 또한 우수하게 유지되므로 이 분야에 대한 관심이 급증하고 있다.
- <16> 현재까지의 형질전환동물 생산기술에서 목적단백질을 생산하는 조직은 주로 단백질 발현율이 높은 것으로 알려진 유선 조직이었다. 그러나 동물실험 결과, EPO와 같은 몇몇 중요한 단백질의 경우, 우유(milk)에서의 발현은 유선조직 이외의 타조직에서의 발현 때문에 궁극적으로 목적단백질을 생산하는 것이 불가능한 것으로 나타났다. 또한 우유에는 원래 알부민 등 여러 종류의 단백질이 다량 포함되어 있으므로, 결과적인 목적 단백질 수율은 낮아진다.

<17> 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 방광을 이용한 유용단백질 생산방법이 최근 시도되고 있다.

<18> 방광은 동물의 연령이나 성에 상관없이 일생에 걸쳐 소변을 생산하며, 소변 중에는 단백질 및 지방 성분이 5~25mg/l 수준의 극소량만 포함되어 있어 목적단백질의 분리 및 정제가 훨씬 용이하다.

<19> 그러나 지금까지 개발된 방광특이적 프로모터를 이용하여 형질전환된 동물의 단백질 생산 효율은 실제로 매우 낮은 수준에 머무르고 있다.

<20> 따라서, 목적단백질 발현을 높은 효율로 촉진하는 방광 특이적 프로모터의 개발이 시급하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 본 발명에서는 돼지의 방광에서 특이적으로 목적단백질의 발현을 촉진하는 유로플라킨 II 유전자의 프로모터를 분리하고, 이를 이용하여 유용단백질을 대량 생산할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<22> 본 발명은 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터를 제공한다.

<23> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 구체적으로 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.

<24> gggctaggagtgggaatcagagctggcctatgccacagcaacgcagaatccaaaccacatctccgacctacaccagaccgtcacataacacaggatccttaacccactgagcaaggtcagggatcaaaccctaatcctcatggatactagtctgggttcttaacccgctgagccacagtgggcactcctgtttttgtttgtgtcttcgttttttggtgcatctgcagcatacagaagttcctgggttaaggattgaaccatgccacagcagcaacccgagccacagcagtgacaacagcctgatccttaactgctagaccaccaggaacgccccctcaactttt

catgccttggaaccctgagtcagtacaacctgacaatngntttttttttttttttttttgccttttctagggccacttcccgcggc
atgtggagattcgcaggctanaggtctaatacgagctgtagccaccggcctacaccagagccatagcaacgagggatccgagccgagt
ctgcaacctacactacagctcatggcaacaccggatcgtaaaccactgagcaaggccaggggatcgaaccgcaacctcatggttcc
tagtcagattcgtaaaccactgcacatgacaggaactcccaacctgacaattttatcatttctgcaccctagttgttgagtaatttg
aaaaattccaagatgtcaaggtcagtgatggttaattttatgtgtcaacctgactaggccatgttgcccggatgtggagtcattg
ttattctggatgttactgtgaagatatgttttgatgaaattaacatttaaatcagtggggggaaaaaagaagtctcgttctggtg
catcagaacaaatccgactaggaacaagcggttgcaggttcgatccctggcctcacttagtggagtcaggatctggcgttgccgtg
agctgtggtacaggtggcagatgcagctcggatctagcattgctgtggctgtggtgtaggccagcagctgtagctctgattaaacccc
aagtctgggaacctccatatgccgtgggtgtggccgaaaaagcaaaaaataataaataaataaatttaaacagggggattttgagc
aaagcagattaccccataatatgggtgggtctcatcaagttcatgtaggccctagtgaacaaagaccgacctccaccttctcccca
tgagaaggaaagaattctgccaaaagaccgccttnggacntaaactgcaactctttcctgagtttccagcatgttgg
cctcccccatcagactttggacttgccaagcctccgcaattgcatgagccaattccttaaaataaatccgtctatatacacatcct
gttggttctgttttctccagagaacctgactaacgcagctctgcaccctgaagaccagtgggtccccacactcagctgggtgtcacctc
caaacactcagccttctcaaggctctttctagctgtgtcctcctctccccacaacagctgtttcaaactctcaccctcttccagggc
gcaatcccttctcctccctgagtttctacttcccagagaaagcagagaccttcaggagtgtgctgccttaacttacttccctcatcc
ctcagccttgcaaaagtataagctttctctgcaccactgccccattcttctctctgcagacagggtcattcctaaagccaaacgctaa
tgctccacctctgatctgagtcacatcttttccctcctccagaagcttccataaattctaccccttttcttcccttatctttatc
tttgaaaacaaaatggaagacagccttcccgttgtggtgcagcggaacagtggtgccttggaagcgctgggacgcaggttcgacccc
tgggccagcatagtaggttaaggatccagtggtgccacagttttggcttagattgaaactgcagctcagatctggtccctggcctggg
aacttcatacgccacaggacggcccaaaaagaaaagaaaagaaaaataaaaaacaaaacagaaaagcctttcctgtaccccaattcc
ctccagttatctctctctttcccttcccagccaagctctgcaaagagcggctctgcacagttctaactctacctcctccagttggccc

tggactttctcagtctggcttctacccccctcaccgtaggaatctgctctgaaggacacgcacccctcacgatccttggcccaggga
cattttttgtaccagcctttcaatcctgaccttcataatcatccgacacctcctttgtgaaacctccatccactttctcctggttccc
ctcctaagaccattccgccttcttcagccccctccctccatctgtccttttagatgccgcatttccctagtatcctgtcctgcgcggnc
tcgtccttcccttccacaactctcttcaaggactcttttctccatgtgcgattttgcccatggcccaccttccctctctttaccaga
ctttcccccggtgctccagactcatagactcaattatgaaaacatagttttcatctgatttgcccaagatatttgcattagttattac
tgtataacagcttatcccccaatttagtggcttataaaataaacacttattctgagaatcagaaacctaggcaggacatagttggggt
ctcatgaagttgcactgaaaatgtccccctgggctaatacatcggaggactgaccagggtggaggatctgttccaagctcattcatt
cacatggccgtaggttgagacagctcttctctggatcttggca

ggagcctcaattccttgtcacgtggacctccccttggagggggtcccatgtcctccatggtgagtaatccatgagagcaaggtggaag
gtgccatgccatttaggacctagcctcaggagggacctacgtcacttctgttgtagtctgttggccacacagactaacctgacacaa
tgcacccatccatgacctgctgccagtccattctccacactgtttccagaatgatatttacataagtaaaactcctcaaaggcttttg
agatTTTTTTTcccattatagttgatttataaacctcagaggcttttgttttcttcagcataaaaaccaagttccttaacatagcatgt
aaccactggccaccctgccagtggctagaactctcaccatgtccatccttgaatactgctttctagccaagagctattgtttgcagt
tcccagaatgtgtcgggataactcacatctctgagccttttcatgtgctgttccctcactttggaatatccccttccatttaggaagg
ctaatgtccattcatntccaaaactcagaagcaaattttttttttttttttttttttttttttttgcttttagggccgaactctca
gcatatggagggttcccagggttagccatcaaattggaattgtagctgctggcctacaccacagccatagcaacaccagaccaagtac
atctgcaacctacatcacagatcatggcaatactggatccttaaccactgagtgagcccagggatcaaacacaaattctcatggata
ctcgccagggttattaccactgagccacaacaggaactcctctccttttatggtcacacctgcagcatatggaagttcctgggccag
ggattgaatctgagtggcagctgtgacaatgccgtatcctttaattcactgtgctgggctgaggggntaaantgccctcctaaaaaa
cctgagctgctgcagttggattcttaatccactgcaccacaagggggaaggtcaagaactgtcttgccatctctgtatcttatcacct
agcatagtaccaccatagagaagttgctcaacaaatgtttactgaatgaataaatgcatgagctggagttccattgcggtcagca
gtacaaacctgactagcattcataagaacttgggttcgatccctagcctcagtggttaaggatgcagcattgctgtgagctgtgt
gtaggtcgcagacgacactcagatcccacattgctgtcactgtggcgcaggccggcctctgtagctctgattcgactcctagcctggg
aacgtccatatgccacaggtgaggccctaaaaagaaataaataagcaagcaagtaagcaagcaggcagtttcttggtgccttgtacc
ctgtggcctgtgtggtatacaagtaacagctgatccatgtctcagtcagtttccccctcagactacctttcctgccccatctctccc
tttgacataattgaaaaacaaattcagaattttgtcccactac

ctttcttgctagctctgtggccttgggaaagctatttattgcctctgagcctctaattttcatctgcaccaaggatttaataaaaagga
gaggataagatgaattacttatattaataatttattgaaccagatactgtgctaggcactcttaataaatttagcttgagtgatagtca
tagtatcctgggtgagacagatttttttttcccttttattggttgacgtgcaacatatggaagttcctgggctggggtcgaattggagc
tgcaggtgcttgccatgccacagccatggcaacatcatatacaaaccgcacctgtgacctacaccacagattgcagcaacgctggat
ccttcaccaaggagcaaggccaggaatcaaatgtgcatcctcaciaacactatgtccggtttttaaccgctgagccacaccaggaa
ctccatggcgagacagattttatactctgtctacagaagaggaaagtgaagctcagaatggttaggtaggttaacttggccaagatcaa
aaaattcaaagaagatttggggcaagtggatgatcatggcagcattagaaaaaataaagaagcatccacttggtttccaacactgaa
caactgagattttcttactctcacagctttttccagcttcatatccaaggacagacgctctgccattttcccatcagaccaatatgtg
ctgaacactgcacctttacttttaggtccaagtcaccaggggttttccagtttgctcctacagattctgacactatctccacatttt
ttttgcacctttattttaagcatttttatacctgtcaccttgctagataaatgggaaggaatgaatcttcccatttataggtgag
aaaattgaggttcaaagtgactcaccaaaagtcatatagcatcactcctcaacaggaggacagcagtcaccaccagagggttaacatgt
ccatggagcctagtggacacatttttctaactgactgggaagcagcagagtggatgtgaagggggaatcataggtatatcaaacag
acttaggttctgatccgagctattctgcttgcaaacaaccatagttcaatttaaaaaaaaaaagaaagaaagaaagaaagaaaggag
ccccatcctgggtgcagtggaaacaaattcaactaggaactgtgaggttgtgggttcgatccctggccttgctcagtggttaaggat
ctggcgttgccatgagccgtggtgtaggttgacagactcaactcagatctggcgttgctgtgactgtggctgtgatgtaggctggcagc
tgtaactccggttagacccagcctgggaacctccatatgcaacctccatatgcggtgggtgtggccctaaaaagaaaaaaaaaaaaa
aaagaggaattcccttatggctcagcaggttaaggatctggtattgtcactgctgtggctctagttacagccatagtgcaggttcaat
ccctggcccaggaacgtctgcatcccacaggtgtggccaaaaaa

gaaagaaaggaaggagt tctgt tgtggcacaataggattggcaacatcttaggagtactgggacacaggttcaatccctggcccagca
cagtgggt aaggagccagtgttgctgggtcaaaaaagaaaagaaaagt accatagttagagtaaatctgttttaggagctattctttg
gggcagaacagagagatcaggagctccttgagagcagaaacttacctttacatccctcgtgcctagcacggttctaggggcatacctg
gtatttaataaatatagccaactggataggggattggaaggaaagagcaggggagggaacttgagtgagttgaaaaattgagaatcca
aaggggagacagcctagaaagagttaggtccaagaaagagatcccaggcatttgtggccctgggtccctttttccaagccatgaggaaa
tctcagaggaacagagtgtgtggctttaaatgacttcagcgttgtcaatgaatctgctcggctaaaagagttatcctcttgctcct
tcgcttgctcctccccctcctctcagctcccaaacccttctcggctgctgtgatgggataattagatgcgagagctcagcacagatga
tgctccagttgcctagcaactaatggtttccatggagaccgcaaagcacagcctccagagcagccagtgagcagctcggcagggcagg
gagaagacgcaactctcagctcctccagaaacctggggagggccaggagtggggaagaagggggggatcggagggcttaaaggcacag
gccccctcttatcctcttaaaatctggtcagagctctgcctcccctcccctactctgtcccactcataatttcagatggagttggggg
cttaggagtggaccaacacaacctaccctgcaataaacccaaccttctttctgcttctggtttgtggctgaaaatggnaaaagaaat
ctcccaagtgaagtgtaaacancntcctgggttggaatgggatctgaagagtactaagatccctcagacctggaattccaccattt
agtctttccctctctccaaagttctcaatgtgaaaagatcctctttcagtttgagagcaatgataggatcttctaaaaggagacaa
aagccaaggtgcaggaaaaatagaattcagttcttcacccaaggcagcctgtcctgggagacaggggtgaaacacttggtcctgatc
tccatcagaggatccagagtgtgtgtgtttgttgctggggagggggacacaatatagagcatctggtgactcaaagtatgtgcctccc
agagtagcatcaatcaatgttacctggaagcttgtagaaatgcagaatttcaggcttcacctcagacccactgaatcagaaactgca
tcttaacaagatccctcatgattcatacgcacattaaatttggagaagcgctgacctgagaccctcctcctctctgcttgggcccata
gttctacctttattgtcacctcgtctcacctcgtgctcatacc

caggctttgagcctacccttcccccatggggaaaggacacaaggccaccagccctcacttccctaccaggacctggccctcctct
gggactggagaaggacaaagaggacccctctgtggaggtctacgacctctcctgaccaagtagtccactcaccacaagtggctctac
ctctctgagtctcagtttccacatccacaaaaggtggccaatgctatctgccaccagaatggctgtgagggtggagcaggcaaagcc
tctgtgccatcagagaaattgtgtctctttttcattttctcccagtgggtttctttctcgtctttattcttttttttttttttttct
ctgtctgttgtatttttagggccgtgcctgtggcatacggaagttcccagggtagggtccaatgggagctgtagccccgggcctacg
ccacagccacagcaatgtgggatctgagccacgtctgcaacctacaccacagctcacggcaacaccagatccttaaccactgagcaa
ggccagggtcgagcccacgtcctcatggatgctagttgggttcgttaaccgctgagccatgatgataactcctctttctattcttta
gtcaciaaacagtcaacaaaggttgctgaccaaggctgatcgtgccacccccagccccagactgggccagtgccaccccttggg
tctctctggaaatcctgcccagcatcaattggctccactctccaggaggatgggaagccctgtggcccctgggactcacaccctctg
catctcccagagtgcaggacctgggtcttcaggagacaccaagaactgggtcccccggtctgctgccccacccctactaccagttt
ctctccattcctgcccagttccaggccccctggggttactctcctctctctgtacaccagtgcacacctcagaacctgcttccctcctg
ggaacaccactaccacgtgggagaaggggtcgtctaggggttgggcccagatacacttgtaagcaggaacacacgagcccttacat
gtgggtgtcccgaagaaggggttttccacccccgctttagtaccctgccctctgcagctgcctgagccaccaagaccagcca
aggtctcctgccttctggcctgagggccagctccccatcctgaaaaacctgtctgggggcctcccctgaggctgtagggcccaaggcc
tcccctgaggctgtagggcccaaggggcaggttgaacaggattcccctctggcccctcctacccccaggacaaaaccagagccccagg
acagggcctcacttgccctcaggaaaccacagcttgccagcaccagcccagcaccagcccagct

<25> 또한 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 상기 서열번호 1의 염기서열

에 하나 이상의 붕괴(disruption), 결실(deletion), 삽입(insertion), 점(point), 치환(substitution), 논센스(nonsense), 미스센스(misense), 다형현상(polymorphism), 재배열 돌연변이(mutation)가 일어난 기능적 등가물 중 선택된 하나가 될 수 있다.

- <26> 본 발명은 상기 프로모터의 전체 또는 일부를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현백터를 함께 제공한다.
- <27> 본 발명의 발현 백터는 구체적으로 상기 프로모터를 포함하며, 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <28> 또한 본 발명은 상기 발현 백터를 동물의 수정란에 도입하고, 상기 수정란을 이용하여 형질전환시킨 동물을 제공한다.
- <29> 또한 본 발명은 형질전환동물로부터 소변을 수거하여, 발현된 목적단백질을 분리·정제하는 방법으로 이루어진 유용단백질의 대량생산방법을 함께 제공한다.
- <30> 본 발명의 프로모터는 돼지의 유로플라킨 II 구조유전자의 5' 쪽에 위치하여 유로플라킨 II 구조유전자의 발현을 조절한다.
- <31> 본 발명의 프로모터는 돼지의 게놈 라이브러리(genome library)를 스크리닝(screening)하여 분리할 수 있으며, 그 분리 방법은 다음과 같다.
- <32> 우선 스크리닝의 프로브로 사용될 돼지 유로플라킨 II 유전자의 염기서열 일부를 얻기 위해, 염기서열이 공지된 다른 동물들의 유로플라킨 II 염기서열을 비교하여 중간에 잘 보존된 부분을 바탕으로 프라이머를 제작하고(정방향 프라이머: 서열번호 2, 역방향 프라이머: 서열번호 3), 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)를 주형으로 하여 RT-PCR을 수행한다.

- ▶ RT-PCR을 통해 유로플라킨 II 염기서열의 일부를 얻은 후, 이를 프로브로 하여 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝한다. 본 발명에서 사용한 프로브는 도 2에 나타난 바와 같이, 유로플라킨 II 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다.
- 4> 라이브러리 스크리닝 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 유로플라킨 II 구조유전자 또는 프로모터 부분을 포함하는 클론들을 얻고, 이들의 염기서열을 비교하여 프로모터의 염기서열을 최종적으로 결정하여, 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 완전한 염기서열을 얻는다.
- 35> 이렇게 하여 얻은 프로모터는 총 8847bp의 크기를 가지며, 그 염기서열에 있어서 세포에서 항상 일정하게 발현되는 유전자(housekeeping gene)의 특징인 높은 G/C 함량을 나타내며, AP2 및 GATA 박스 등의 다양한 Sp1 엘레먼트(element)를 포함한다.
- 36> 본 발명의 프로모터는 돼지의 여러 신체 조직 중 방광조직에서만 특이적으로 단백질을 발현시킨다. 돼지 유로플라킨 II의 경우, 전체 방광세포의 8~14% 정도에서 발현되며, 특히 방광상피 상부기저세포(urothelial suprabasal cell) 중 활발하게 증식하며 세포분열 중인 우산세포(umbrella cell)에서 높은 발현율을 나타낸다.
- 37> 이처럼 본 발명의 프로모터는 높은 효율로 단백질의 방광 특이적 발현을 유도하므로, 본 발명의 프로모터를 이용하면 방광특이적으로 외부에서 유래한 목적단백질을 발현하는 발현 벡터를 제조할 수 있다.
- 38> 본 발명의 발현 벡터를 제조할 때는, 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여, 본 발명의 프로모터를 삽입하고, 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 삽입함으로써 제조한다.

- <39> 본 발명의 발현 벡터에서, 기본 골격으로 사용되는 벡터는 일반적으로 사용되는 발현 벡터 중 적절한 하나를 선택하여 사용할 수 있으며, 그 예로 다양한 클로닝 부위를 가진 pBluescript SK 계열의 벡터를 비롯하여, pLNCX 등의 리트로바이러스 벡터(retroviral vector) 등을 들 수 있다.
- <40> 본 발명의 발현 벡터는, 의약품의 유효성분으로서 사용되는 모든 단백질, 즉 EPO(erythropoietin), 알도스테론(aldosterone), 아드레노코티코트로핀(adreno-corticotropin), 혈액응고인자(blood clotting factor), 고나도트로핀(gonado-tropin), 인슐린(insulin), 프로락틴(prolactin) 또는 바소프레신(vasopressin) 등을 발현시킬 수 있다.
- <41> 또한 본 발명의 발현 벡터는 필요에 따라 조절인자들, 즉 또다른 프로모터, 인핸서(enhancer), 선택적 표지 유전자(selective marker), 5'-UTR(untranslated region), 3'-UTR, 폴리아데닐화 신호(polyadenylation signal), 리보솜 결합 서열, 게놈의 특정 부위로 삽입될 수 있는 염기서열, 또는 인트론을 적절한 위치에 추가로 포함할 수 있다.
- <42> 본 발명은 유로플라킨 II 프로모터를 포함하는 발현 벡터의 바람직한 예로, 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 발현할 수 있는 발현 벡터 pUP2/hEPO를 제공한다(도 3).
- <43> 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 pBluescript SK(-) 벡터를 기본 골격으로 사용하며, 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 3' 쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(Lin F. K. et al, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, Cloning and expression of the human erythropoietin gene, 82:7580-7584, 1985, 서열번호 4)가 융합되어 있다. 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO는 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.

- 44> 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEP0는 필요에 따라 네오마이신 저항성 유전자 (neomycin-resistant gene), 인슐레이터(insulator), 또는 WPRE(woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) 등을 추가로 포함함으로써, 형질전환 세포주의 구축을 용이하게 하며, 목적단백질 발현량의 극대화 및 발현의 안정성을 도모할 수 있다.
- 45> 네오마이신 저항성 유전자는 세포주 구축시 사용되는 G418 시약에 대해 저항성을 나타내는 유전자로, PII 프로모터의 조절 하에 단백질을 발현하는 동물세포주(animal cell line) 구축시 효율적인 선택적 표지 유전자로서 작용할 수 있다. 네오마이신 저항성 유전자의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 5).
- 46> gcggccgcgcgcgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatattgtttatttttctaaatacattcaaat
atgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataaatattgaaaaaggaagagtctgaggcggaaagaaccagctgtg
gaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtcccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagttagcgaacc
agggtgtggaaagtcccaggctcccagcaggcagaagtatgca
aagcatgcatctcaattagttagcgaaccatagtccgcccctaactccgcccataactccgcccagttccgcccattct
ccgcccataaggctgactaattttttttatattatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggct
tttttgaggcctaggcttttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcag
gttctccggccgcttgggtggagaggctattcggtatgactgggcacaacagacaatcggtgctctgatgccgccgtgttccggct
gtcagcgcaggggccccgggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcgcggctatcg
tggtggccacgacgggcgttcttgcgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaagggaactggctgctattgggcgaagtgc
cggggcaggatctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatgggtgatgcaatgcggcggctgcatacgcttga
tccggctacctgccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggtcttgtcgatcaggat
gatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccagggtcaaggcgagcatgcccgacggcgaggatctcgtcg

tgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggc
ggaccgctatcaggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttac
ggtatcgccgctcccgattcgacgcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctgggggttcgaaatgac
cgaccaagcgacgccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccgccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgg
gacgccggctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgcccaccctagggggaggctaactgaaacacggaagg
agacaataccggaaggaacccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgttgggtcgtttgttcataaacgcgg
ggttcggtcccagggtggcactctgtcgataccccaccgagacccattggggccaatacgcccgctttcttccttttccccacc
caccaccaagttcgggtgaaggcccagggtcgagccaacgtcggggcggcaggccctgccatagcctcaggttactcatatatac
tttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctag
gtgaagatcctttttgataatctcatgaccaaatacccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtccgatcg

<47> 인슐레이터는 프로모터 부근에 존재하는 조절인자의 영향을 돕고, 위치 비의존적인 (position-independent) 발현을 도와주는 인자로, UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 안정적으로 발현할 수 있게 한다. 인슐레이터의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 6).

<48> tcgactctagaggacagccccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctccccgctaggggcagcagcgagccg
cccggggctccgctccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagccgggcacggggaaggtggcacg
ggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctggggggataggggaaaaagctttaggctgaaagag
agatttagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaaggagcacagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggt
catcaaccagcagcccagggtgccagagccacatccagcctggccttgaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggc
aacctgttcagtgcgtcaccaccctctgggggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccatt
cccccttgtcctatcaagggggagtttgctgtgacattgttgggtctggggtgacacatgtttgccaattcagtgcacacggagagggc

agatcttggggataaggaagtgcaggacagcatggacgtgggacatgcaggtgttgagggtctgggacactctccaagtcacagcgt
tcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaagttaaaaccagcatggagaggagcacaaaaaggccaca
gacactgctggtccctgtgtctgagcctgcatgtttgatgggtgtctggatgcaagcagaaggggtggaagagcttgcctggagagata
cagctgggtcagtaggactgggacaggcagctggagaattgccatgtagatgttcatacaatcgtcaaatcatgaaggctggaaagcc
tccaagatcccaagaccaacccaacccacccaccgtgcccactggccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacc
tcagggtgacgtgacccccca
cctccgtgggcagctgtgccactgcagcaccgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgaccctcccctggcacaacg
taaggccattatctctcatccaactccaggacggagt cagt gaggatggggctctagaggacagccccccccaaagccccagggga
tgtaatcagtcctccccgctaggggcagcagcgagccgcccggggctccgctccggtccggcgtcccccgcatccccgagccg
gcagcgtgcggggacagcccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcaga
cacctggggggatacggggaaaaagctttaggctgaaagagagatttagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaaggagc
acagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggtcatcaaccagcagcccaggctgccagagccacatccagcctggcct
tgaatgcctgcagggtggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagtgcgtcaccaccctctgggggaaaaactgcctcctc
atatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccattcccccttgtcctatcaagggggagtttgctgtgacattgttggtctg
gggtgacacatgtttgccaattcagtgcacacggagaggcagatcttggggataaggaagtgcaggacagcatggacgtgggacatg
caggtgttgagggtctgggacactctccaagtcacagcgttcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagc
aagttaaaaccagcatggagaggagcacaaaaaggccacagacactgctggtccctgtgtctgagcctgcatgtttgatgggtgtctg
gatgcaagcagaaggggtccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacctccagggtgacccccccacctccgt
gggcagctgtgccactgcagcaccgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgaccctcccctggcacaacgtaaggcc
attatctctcatccaactccaggacggagt cagt gag

- <49> WPRE는 mRNA의 안정화에 기여하여 단백질 합성량을 증대시킬 수 있는 조절인자로, UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 대량으로 발현할 수 있게 한다. WPRE의 염기서열은 다음과 같다(서열번호 7).
- <50> accaggttctgttctgttaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctcct
 ttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgatggctttcattttctcctccttgtataaat
 cctggttgctgtctctttatgaggagttgtggccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccac
 tggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcc
 tgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggc
 tgctcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccg
 cggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcct
 gtttcgcctcgggctcctcgag
- <51> 본 발명은 상기 조절인자들을 추가로 포함하는 발현 벡터의 바람직한 예로, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 제공한다.
- <52> 상기 벡터들은 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터에 네오마이신 저항성 유전자를 삽입한 후, EPO 유전자의 3' 쪽에 WPRE를 삽입하거나, 또는 UPII 프로모터의 5' 쪽에 인슐레이터를 삽입함으로써 제조한다.
- <53> 본 발명의 발현 벡터로 형질전환될 수 있는 동물은 소변을 분비하는 모든 동물, 즉 돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 등이다.

- <54> 본 발명의 발현 벡터를 이용한 형질전환동물의 생산 방법은 통상적인 방법에 의한다. 형질전환하고자 하는 동물 중 건강한 개체로부터 수정란을 채취하고, 수정란에 본 발명의 발현 벡터를 도입한 후, 정관결찰 생쥐를 이용하여 위임신 생쥐를 얻고, 이를 대리모로 하여 난관 내에 수정란을 이식한 후, 대리모로부터 얻은 자손 중 형질전환된 개체를 선별하는 과정으로 이루어진다.
- <55> 이후 형질전환된 것으로 확인된 개체로부터 소변을 수거한 후, 목적단백질을 분리·정제함으로써 유용단백질을 생산하게 된다.
- <56> 본 발명의 유용단백질 생산방법에서, 분리·정제 방법은 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 여과법 또는 크로마토그래피법 등이 될 수 있다.
- <57> 이렇게 하여 제조되는 본 발명의 형질전환동물은 방광 특이적으로 목적단백질을 발현하며, 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.
- <58> 그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐의 경우, 0.5~1mg/ml 수준의 높은 EPO 발현율을 나타낸다. 원래 EPO는 태아의 조기 사망을 유발하기 때문에 발현시키기 어려운 단백질임에도 불구하고, 기존의 유로플라킨 프로모터를 이용한 소변 중 단백질 발현율에 비해 1000배 이상의 높은 발현율을 나타낸다.
- <59> 또한 본 발명의 형질전환동물로부터 생산된 단백질은 시판되는 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.
- <60> 그 예로, 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO로 형질전환된 생쥐로부터 얻은 EPO는, EPO의 존성 세포인 간세포주(hepatocyte cell line)의 생존율을 시판되는 EPO보다 높은 수준으로 유지시킨다.

1> 따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 그간 대량생산하기가 어려웠던 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

2> 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 설명하되, 실시예에 의해 본 발명의 범위가 국한되는 것은 아니다.

3> [실시예 1] 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 분리

64> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 다음과 같이 실험을 수행하였다.

65> 1) RT-PCR(Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)에 의한 프로브 준비

66> 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 염기서열이 공지되지 않았기 때문에, 염기서열이 공지된 생쥐와 소의 유로플라킨 II cDNA를 비교하여 두 종 간에 높은 상동성을 나타내면서 보존된 부분을 참조하여, 돼지 유로플라킨 II cDNA의 증폭에 사용될 디제너레이트 프라이머(degenerate primer)를 제조하였다. 정방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 2, 역방향 프라이머의 염기서열은 서열번호 3에 각각 나타나 있다.

67> 상기 프라이머를 이용하여, 돼지 방광의 전체 RNA(total RNA)에 대해 MuMLV 역전사효소를 사용하여 RT 반응을 수행하고, 그 결과 얻은 cDNA에 대해 Taq 중합효소를 사용하여 PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA는 염기서열 판독 결과, 유로플라킨 II의 구조유전자 일부인 것으로 확인되었으며, pGEM T- easy 벡터를 사용하여 클로닝하였다.

- <68> 유로플라킨 II 프로모터를 분리하는데 사용될 프로브를 제조하기 위해, 상기에서 클로닝한 DNA 50ng을 3분간 끓인 후, 얼음에서 식혀 변성(denature)시켰다. 변성된 DNA를 프라이머, dNTP, [α - 32 P]dCTP(3000 Ci/nmol, NEN)를 함유하는 반응 완충액에 첨가한 후, 클레노우 효소(Klenow fragment)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 하여 제조된 프로브는 유로플라킨 II 구조유전자의 2번 엑손부터 5번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 A, 그리고 1번 엑손부터 2번 엑손에 걸치는 부분을 포함하는 프로브 B의 두 종류이다(도 1).
- <69> 이후 반응액을 세파덱스 컬럼(Sephadex G-50 column)을 사용하여 정제함으로써, 32 P로 표지된 돼지 유로플라킨 II 프로모터 탐지용 DNA 프로브 A 및 프로브 B를 준비하였다.
- <70> 2) 라이브러리 스크리닝(Library Screening)
- <71> 돼지 유로플라킨 II 프로모터를 분리하기 위해, 돼지의 게놈 라이브러리를 스크리닝하였다. 본 실시예에서 돼지의 게놈 라이브러리는 람다 픽스 II 파지 벡터(lambda FixII phage vector, Stratagene)에 삽입된 것을 사용하였다.
- <72> 라이브러리를 도입할 호스트 박테리아는 다음과 같이 준비하였다.
- <73> 0.2%의 말토오스(maltose)가 함유된 LB 배지 5ml에 박테리아 콜로니 하나를 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 상기 배양액의 1%를 다시 새로운 0.2%의 말토오스 함유 LB 배지 50ml로 옮겨, 2.5시간 동안 배양하였다. 600nm에서의 흡광도가 0.5 정도 되었을 때, 배양액을 2500rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. 그 결과 얻은 세포 침전물을 멸균한 10ml 황산마그네슘 용액에 현탁시켜, 최종농도가 1×10^{10} 세포/ml이 되도록 하고, 실험할 때까지 4°C에 보관하였다.

- 74> 라이브러리를 적정(titration)하기 위해, 라이브러리를 SM 용액에 여러 농도로 연속 희석(serial dilution)하였다. 고체 LB 배지가 담긴 플레이트(plate)를 37℃ 항온반응기(incubator)에서 데우고, 탑 아가(top agar)를 녹여 48℃로 유지되는 수조에 놓아두었다. 여러 농도로 희석된 파지 용액 10 μ l 와 상기에서 준비한 호스트 박테리아 100 μ l를 혼합하여, 37℃에서 호스트 박테리아를 감염(infection)시켰다.
- 75> 탑 아가에 파지로 감염된 호스트 박테리아를 첨가하고 잘 흔들어 준 후, 상기에서 준비해 둔 LB 배지 위에 부었다. 15분 후 플레이트를 거꾸로 뒤집어 37℃ 항온반응기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 밤새 배양한 플레이트의 배지 상에서는 파지가 호스트 박테리아 내에서 라이브러리 DNA를 복제한 후 호스트 박테리아를 용해시킨 흔적인 플라그가 형성되었으며, 이후의 실험 단계를 위해 배지를 4℃에서 1시간 이상 식혔다.
- 76> 상기 플레이트에 대해, 일련 번호를 기재한 NC 필터를 준비하고, 필터의 가운데 부분부터 당도록 하여 상기에서 준비한 라이브러리 DNA 플레이트 위에 필터를 덮었다. 필터에 바늘을 수직으로 찌러 위치를 표시하고, 1분 후 조심스럽게 필터를 배지로부터 떼어냈다.
- 77> 각 필터를 변성화 용액(denaturation solution), 중성화 용액(neutralization solution) 및 2 ×SSC 용액에 차례로 1분씩 담근 후, 80℃ 오븐에서 2시간 동안 두어, 전이된 라이브러리 DNA가 필터 상에 완전히 고정(immobilization)되도록 하였다.
- 78> 고정된 필터를 2 ×SSC 용액 상에 띄워 적신 후, 전혼성화 용액(prehybridization solution)이 들어 있는 페트리 디시(petri dish)에 하나씩 담그고, 68℃에서 1시간 동안 살살 흔들어 주면서 전혼성화 반응을 수행하였다. 전혼성화 반응 후, 상기 실시예 1의 1)에서 준비한 프로브를 첨가하고, 68℃에서 18시간 동안 살살 흔들어 혼성화 반응을 수행하였다. 혼성화 반응 후, 0.1% SDS를 함유하는 2 ×SSC 용액에 필터를 담그고, 65℃에서 10분 동안 흔들면서 세

척하는 과정을 2번 반복하였다. 세척 후, 필터를 공기 중에서 건조시키고, 자기방사기록법 (autoradiography)을 수행하였다.

> 자기방사기록과 플레이트를 대조하여, 양성 반응을 보이는 플라그를 선택하고, 플라그를 SM 완충액 500 μ l에 넣고 클로로포름(chloroform) 한 방울을 첨가한 후 잘 섞어 4℃에 보관하였다. 상기와 같은 스크리닝 과정을 세번 반복하여, 양성반응을 나타내는 클론들을 최종적으로 얻었다. 각 클론이 함유하는 DNA는 정제 키트(Qiagen lambda mini kit)를 이용하여 정제하였다

30> DNA 염기서열의 판독은 ABI 377 DNA sequencer(Applied Biosystem)을 이용하였으며, 서열판독결과는 CAP2 sequence assembly system을 사용하여 처리하고, 서열비교는 BLAST, SMART, PROSITE 등을, 그리고 모티프(motif) 분석은 Clustal W 프로그램을 사용하였다.

81> 그 결과 프로브 A를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 A 및 클론 B를 얻었으며, 프로브 B를 사용하여 스크리닝한 경우, 도 1의 클론 C 및 클론 D를 얻었다. 이들 클론은 각각 돼지 유로플라킨 II 프로모터 또는 그 3' 방향으로 구조유전자를 포함하고 있으므로, 이들을 비교하여 돼지 유로플라킨 II 프로모터의 완전한 염기서열을 얻었다.

<82> 본 발명의 돼지 유로플라킨 II 프로모터는 총 8847bp의 크기로, 그 염기서열은 서열번호 1에 나타나 있다.

<83> 3) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상 확인

<84> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 발현 양상을 확인하기 위해, 돼지 유로플라킨 II의 발현을 다음과 같이 확인하였다.

- 35> 3-1) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광 특이적 발현 확인
- 36> 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 특이적으로 발현됨을 노던 분석(Northern analysis)을 통해 확인하였다.
- 37> 상기 실시예 1의 2)에서 얻은 돼지 유로플라킨 II cDNA를 프로브로 하였으며, 이때 대조군으로 모든 조직에서 일정하게 발현되는 액틴에 대한 프로브도 준비하였다. 상기 프로브들을 사용하여 여러 종류의 돼지 신체 조직에서 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현을 확인하기 위해, 방광, 심장, 간, 신장, 폐, 자궁 및 지라 등 의 조직에 대한 전체 RNA에 대해 다음과 같이 전기영동을 수행하였다.
- 38> 아가로스(agarose) 0.7g을 250ml 용량의 삼각 플라스크에 넣고 증류수 58 ml을 첨가하여, 전자레인지에서 완전히 녹인 후 60℃로 유지되는 항온 수조에서 식혔다. 아가로스 겔의 온도가 60℃ 정도로 맞춰졌을 때, 10 ×이동완충용액(running buffer) 7ml을 조심스럽게 흔들면서 첨가하고, 추가로 11.9ml의 포름알데히드(formaldehyde)를 첨가하여 1 ×포름알데히드 이동 겔 용액을 준비하였다. 미리 설치된 전기영동기구에 상기 용액을 붓고 20분 정도 방치하여 겔을 제조하였다.
- 39> 미세원침판에 RNA 6 μ l, 10 ×이동완충용액 2.5 μ l, 포름알데히드 4 μ l, 포름아미드(formamide) 12.5 μ l를 잘 혼합하여, 65℃에서 5분간 가열한 후 얼음 속에서 냉각시켰다. 상기 시료에 겔 로딩 완충용액(gel-loading buffer) 2.5 μ l를 첨가하여 잘 혼합한 후, 50 V로 약 5분간 미리 전기영동시킨 겔에 로딩하여 1 ×이동완충용액에서 120 V/cm로 전기영동을 시행하였다.

전기영동 후, 0.05 N 수산화나트륨 용액에 젤을 약 10분 정도 담가두어, 이후의 전이과정에서의 효율이 증진되도록 RNA를 부분 절단하였다.

- <90> 젤을 pH 7.5의 0.1 M 트리스 용액에 30분간 담가두고, 다시 20 ×SSC 용액(3M 염화나트륨, 0.3M 염화시트레이트(sodium-citrate), pH 7.3)에 약 30분 가량 담가둔 후, 양이온으로 하전된 멤브레인을 이용하여 RNA를 전이시켰다. 전이가 끝난 멤브레인은 RNA 고정을 위해 80℃에서 2시간 동안 두었다.
- <91> 멤브레인을 비닐 백에 넣고 멤브레인이 완전히 잠길 수 있는 최소 부피의 혼성화용액을 담은 후, 68℃의 진동 항온반응기에서(shaking incubator)에 1시간 이상 보관하였다. 이후, 용액을 빼내고 프로브가 함유된 혼성화용액 15ml로 교체하여 68℃의 진동 항온반응기에서 하룻밤 동안 방치하였다.
- <92> 혼성화 후, 상온에서 세척용액 1(2 ×SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하고, 이후 55℃에서 세척용액 2(0.2 ×SSC, 0.1% SDS)을 교체해가며 30분간 멤브레인을 세척하였다. 멤브레인을 상온에서 완전히 건조시킨 후, 자기방사기록법(autoradiography)을 수행하여 돼지 유로플라킨 II mRNA의 발현 여부를 비교하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- <93> 도 3a에 나타난 바와 같이 대조군인 액틴 mRNA은 모든 조직에서 고르게 발현된 반면, 도 3b에 나타난 바와 같이 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 유로플라킨 II mRNA는 돼지의 방광에서만 특이적으로 발현되었다(도 4b).
- <94> 따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 특이적으로 단백질을 발현시킴을 알 수 있다.
- <95> 3-2) 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질의 방광상피 특이적 발현 확인

- <96> 한편 본 발명의 프로모터의 조절 하에 발현되는 단백질이 방광 조직 중 어느 세포에서 발현되는지를 확인하기 위해, 다음과 같이 면역조직염색을 수행하였다.
- <97> 돼지 방광 조직의 파라핀 절편을 준비하여, 히스토클리어(Histoclear) 용액에 약 10분 동안 담가 파라핀을 제거하였다. 절편을 점차적으로 농도를 감소시키면서 알콜 수용액에 담가 탈수시킨 후, 3% 과산화수소를 함유하는 메탄올 및 0.1% 펩신을 함유하는 0.05N 염산(pH 2.25) 용액에 30분 동안 담가두어, 비특이적으로 염색되는 것을 미리 방지하였다.
- <98> 상기 절편을 TBS 완충액(0.05 M 트리스, pH 7.4, 0.85% 염화나트륨)을 이용하여 5분간 두번씩 세척한 후, 1:5의 비율로 일반 말 혈청을 희석한 TBS에서 블로킹(blocking) 반응을 수행하였다.
- <99> 블로킹된 절편은 1:500의 비율로 1차 항체를 희석한 TBS에 하룻밤 동안 담가두었다. 이 때 1차 항체로 돼지 유로플라킨 II 단백질에 특이적으로 결합할 수 있도록 제조된 다중클론항체(polyclonal antibody)를 사용하였으며, 음성 대조군으로 ABC 키트의 말혈청 1방울을 사용하였다.
- <100> 1차 항체 반응을 수행한 절편을 TBS로 5분씩 2번 세척하여 과량의 항체를 제거한 후, 바이오틴(biotin)이 부착된 2차 항체와 30분간 반응시켰다. 이후 절편을 TBS로 5분간 3번 세척한 후, ABC 시약과 30분간 반응시켰다. 다시 절편을 TBS로 세척하고, 1% 트리톤(Triton)-X 100을 함유하는 PBS로 30초 헹구어 준 후, 0.5% DAB(diaminobenzidine) 및 0.01% 과산화수소를 함유하는 0.05M 트리스 완충액(pH 7.6)과 반응시켜 발색 반응을 수행하였다.
- <101> 발색 반응 후, 절편을 물로 세척하고 탈수시키고 마운팅한 후, 광학현미경 하에서 발색된 부분을 관찰하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.

- 2> 도 4a의 대조군에서는 어떠한 양성반응도 나타나지 않았으나, 도 4b에서 방광조직에 유로플라킨 II 단백질에 대한 항체를 반응시킨 결과, 본 발명의 프로모터는 유로플라킨 II 단백질을 돼지 방광상피에서만, 특히 상부기저세포의 세포질에서 특이적으로 발현되도록 조절하는 것으로 나타났다.
- 33> 3-3) 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 발현을 확인
- 34> 방광상피세포는 단백질 합성이 활발하게 일어나는 유선조직에 비해 상대적으로 단백질 합성 능력이 낮은 것으로 알려져 있으므로, 본 발명의 프로모터 조절 하에 발현되는 단백질의 실제 발현 수준을 레이저 스캐닝 세포분석(Laser scanning cytometry: 이하 'LSC'라 한다)을 통해 다음과 같이 확인하였다.
- 105> 돼지 방광조직을 잘게 찢어, 1mg/ml 콜라게나제 타입 I(collagenase type I, Sigma), 0.51 mg/ml 히알루로니다제(hyaluronidase, Sigma), 50 μ g/ml 젠타마이신(gentamicin)을 함유하는 DMEM/F12 배지(Gibco)에 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 분해반응을 수행하였다.
- 106> PBS로 세척한 후, 60 μ m 나일론 망(Milipore)을 사용하여 큰 덩어리를 걸러내고, 현탁된 단일 세포들을 0.1% 젤라틴으로 코팅된 Lab-Tek 체임버 슬라이드(Nunc)에 부착시켰다. 슬라이드에 부착된 세포들을 차가운 PBS로 세척한 후, 차가운 메탄올로 15분간 고정시키고, 0.1% 트리트론-X 100 용액에 10분간 처리하였다.
- 107> 고정된 세포들을 1% BSA를 함유하는 PBS 용액에서 1시간 동안 블로킹시키고, 상기 실시예 1의 3-2)에서 제조한 유로플라킨 II 다중클론항체를 1:100으로 희석한 용액에서 2시간 동안 실온반응시켰다. 세포들을 PBS로 세척한 후, FITC가 부착된 항-생쥐 IgG 2차 항체(Cappel

Laboratories)와 반응시켰다. 이때, 음성대조군으로서 2차 항체만 반응시킨 군도 함께 준비하였다.

108> 0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS로 3번 세척한 후, 전체 세포수를 측정할 수 있도록 50 μ g/ml PI(propidium iodide)로 염색하였다. LSC 분석시 488nm의 아르곤 레이저로 형광을 방출시키고, FITC의 경우 530nm에서, PI의 경우 570nm 필터를 이용하여 각각의 형광 발현을 관찰하고 그 결과를 도 5에 나타내었다. 음성대조군에 대한 분석결과는 도 5a, 방광 세포 중 유로플라킨 II를 발현하는 세포에 대한 분석결과는 도 5b, 유로플라킨 II를 발현하는 방광세포의 면역표현형 분석은 도 5c에 각각 나타내었다.

109> 도 5b에 나타난 바와 같이, 전체 방광세포의 8~14% 정도가 유로플라킨 II를 발현하였으며, 도 5c에서 이들은 대부분 활발히 증식하고 분열하는 중인 우산세포임을 확인하였다. 일반적으로 소변 내의 단백질이 보통 5~25mg/l의 매우 낮은 수준임을 감안할 때, 상기와 같은 수준의 유로플라킨 II 발현율은 상당히 높은 것이며, 유선 조직을 이용했을 때보다 더 높은 효율로 단백질을 분리·정제할 수 있도록 할 것으로 추정된다.

110> 따라서, 본 발명의 프로모터는 방광 내에서 우수한 효율로 목적단백질이 발현되도록 할 수 있다.

111> [실시예 2] 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO의 제조

112> 상기 실시예 1에서 분리한 본 발명의 프로모터를 이용하여, 상기 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하는 벡터를 다음과 같이 제조하였다.

113> 기본 골격 벡터로 pBluescript SK(-) 벡터를 정하여, 상기 실시예 1의 2)에서 분리한 본 발명의 프로모터를 삽입하였다. 그후 프로모터의 3' 쪽에 인간 EPO를 암호화하는 유전자(서열 번호 4)를 삽입하였다.

114> 그 결과 얻은 본 발명의 발현 벡터의 구조는 도 2에 나타나 있으며, 본 발명의 유로플라킨 II 프로모터의 조절 하에 EPO를 발현하게 된다. 상기 벡터를 pUP2/hEPO으로 명명하고, 2002년 10월 17일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁하였다.

115> [실시예 3] 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 도입한 수정란의 제조

116> 상기 실시예 2에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 도입한 수정란을 다음과 같이 제조하였다.

117> 1) 수정란의 채취

118> 수정란을 채취하기 3일 전에 암컷 생쥐의 복강 내에 PMSG를 투여하고, 2일 후 오후 5시에 hCG를 투여한 후, 수컷 생쥐와 교배시켰다. 교배 다음날 오전 중에 암컷 생쥐에서 플러그(plug)가 생성되었는지를 관찰하여 임신 여부를 확인하였다.

119> 임신한 것으로 확인된 생쥐를 경추탈골시킨 후, 외과용 가위로 개복하여 자궁의 결합조직부분을 분리하였다. 난관과 자궁 사이를 핀셋으로 찢은 후, 난소와 난관 사이를 가위로 자르고, 핀셋으로 찢은 부분의 자궁 쪽을 잘라 난관을 분리하였다.

120> 분리한 난관을 M2 배지에 넣어 보온판 위에 올려놓고, 온도가 내려가는 것을 방지하였다. 1ml 바늘을 이용하여 현미경 하에서 난관 팽대부를 터뜨려 배아(embryo)를 회수하

였다. 회수한 배아를 미리 실온에 꺼내둔 히알루로니다제 용액에 넣고, 난구세포가 떨어질 때까지 방치하였다.

- 21> M2 배지로 2~3 차례 세척한 후, 13000rpm에서 5분간 원심분리하고, 다시 M2 배지로 2~3 차례 세척하여 정상란을 선별하였다. 선별된 수정란은 파라핀 오일로 도포된 M16 배지에서 2~3 차례 세척한 후, 37℃ 항온반응기로 옮겨 보관해두었다.

- 22> 2) 수정란에 DNA 주입

- 23> 미세조작기(micromanipulator)를 이용하여, 상기 실시예 2-1)에서 채취한 수정란에 본 발명의 발현 벡터 pUP2/hEPO를 주입하였다.

- 124> [실시예 4] 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐의 제조

- 125> 상기 실시예 3에서 제조한 수정란을 이용하여, 본 발명의 프로모터의 조절 하에 인간 EPO를 생산하는 형질전환 생쥐를 다음과 같이 제조하였다.

- 126> 1) 정관결찰 생쥐의 제조

- 127> 대리모를 위임신시키는데 사용할 정관결찰 생쥐는 다음과 같이 제조하였다.

- 128> 6주령의 수컷 ICR 생쥐를 선택하여 마취시킨 후, 핀셋과 가위로 치골에서부터 약 1.5cm 되는 상부의 외피를 정중선을 따라 약 1cm 가량 절개하였다. 절개구가 겹치지 않도록 오른쪽 또는 왼쪽으로 비켜서 근층을 절개하고, 음낭으로 내려와 있는 정소를 복강 내로 이동시켰다.

핀셋으로 정소, 정소상체 및 정관을 분리한 후, 정관 주변의 막을 핀셋으로 분리하여 달군 핀셋으로 정관을 끊어주었다. 정관이 분리된 것을 확인한 후, 근층을 봉합하고 마취가 깰 때까지 가온기에 두었다.

129> 2) 위임신 대리모 생쥐의 제조

130> 실험일 전에 발정이 확인된 ICR 암컷 생쥐를 상기 실시예 3-1)에서 제조한 정관결찰 생쥐와 교배시켰다. 실험일 오전에 암컷 생쥐에서 플러그가 생성되었는지를 관찰하여 위임신 여부를 확인하였다.

131> 3) 난관 내 이식

132> 상기 실시예 2의 2)에서 제조한 수정란을 이식용 피펫에 일렬로 배열하였다. 마취시킨 대리모 생쥐의 외피와 근층을 조금 절개하고, 홍채핀셋을 사용하여 난소, 난관 및 자궁각의 상부를 체외로 끌어내었다. 난소낭을 통해 보이는 부분이 위로 가도록 난소의 위치를 잡고, 지혈 크렌메로 지방조직을 끼워 고정시켰다.

133> 실체 현미경 하에서 난소낭의 막을 절개하고, 난관과 난소를 끌어당겨 난관체를 찾아, 이식용 피펫의 앞쪽 끝부분을 2~3mm 삽입하여 수정란을 배양액과 함께 난관 내로 조심스럽게 주입하였다. 피펫 내의 기포 두 개 중 마커로 하는 첫번째 기포가 난관 내에 삽입되는지 관찰하여 수정란이 확실히 주입되는 것을 확인하였다.

- 4> 상기 대리모 생쥐로부터 자손을 얻고, 그 중 형질전환된 생쥐를 확인하기 위해, EPO의 엑손 1과 엑손 2를 프로브로 사용하여 노던 분석을 수행한 결과, 76마리의 생쥐 중 12마리가 형질전환된 것으로 확인되었다.
- 15> 형질전환 생쥐에 대해, EPO 단백질의 발현 양상을 확인한 결과, 예상한 바와 같이 EPO 단백질은 방광 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다(도 6).
- 36> [실시예 5] 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 인간 EPO의 생산
- 37> 1) 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현을 확인
- 38> 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변 중의 EPO 발현을 확인하기 위해, 형질전환 생쥐로부터 소변을 얻어 여과한 후, HPLC 분석을 수행하였다. 각 분획의 단백질 성분을 조사하기 위해, 전기영동 및 웨스턴 분석을 수행하여 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- 39> 도 7a의 전기영동결과 및 도 7b의 웨스턴 분석결과에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 소변 중에는 EPO가 높은 농도로 존재하였다.
- 40> 소변 중의 EPO 농도를 수치화한 결과, 0.5~1mg/ml 수준인 것으로 나타났는데, 이러한 발현율은 기존의 형질전환동물에서 볼 수 있는 우유 중의 단백질 발현율에 비해 현저하게 높은 것이다.
- 141> 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물은 우수한 효율로 소변 중에 목적 단백질을 생산하게 할 수 있다.
- 142> 2) 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성 확인

43> 본 발명의 형질전환 생쥐로부터 얻은 EPO의 생리활성을 확인하기 위해, 실시예 3의 1)에서 얻은 EPO를 EPO 의존성인 간세포에 첨가하고 배양하였다. 이때, 비교군에는 시판 중인 EPO를 첨가하였다. 배양한 지 24, 48, 72 시간별로 세포의 생존율을 측정하여, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

44> 【표 1】

배양시간	DMEM/F12(%)	FBS	FBS+시판 EPO	FBS+본 발명의 EPO
24	38.5 ±6.8	54.9 ±4.3	58.2 ±6.6	72.1 ±4.7
48	21.6 ±7.4	39.9 ±2.9	50.0 ±2.4	60.4 ±7.5
72	10.0 ±4.6	20.8 ±11.7	39.6 ±3.8	53.9 ±4.0

145> 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 형질전환 생쥐의 소변에서 분리한 EPO는 모든 시간대에 있어서, 시판 중인 EPO보다 더 높은 생리활성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

146> 따라서, 본 발명의 프로모터를 이용하여 제조한 형질전환동물을 통해, 기존의 방법으로 얻을 수 있는 단백질보다 훨씬 우수한 생리활성을 나타내는 단백질을 얻을 수 있다.

147> [실시예 6] 조절인자들을 포함하는 본 발명의 발현 벡터의 제조 및 효율성 확인

148> 1) 조절인자들을 포함하는 본 발명의 발현 벡터의 제조

149> 본 발명의 UPII 프로모터의 조절 하에 EPO 생산을 극대화할 수 있는 벡터 시스템을 확립하기 위해, pUP2/hEPO 벡터에 선택적 표지 유전자 및 조절인자를 도입하여 다음과 같이 일련의 개량된 벡터들을 제조하였다.

150> 1-1) pUPII/hEPO-Neo 벡터의 제조

- 1> UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 발현할 수 있는 세포주(cell line) 구축시 효율적인 선택적 표지 유전자를 벡터 내에 삽입하기 위해, 네오마이신 저항성 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO 벡터에 도입하여 pUP2/hEPO-Neo 벡터를 제조하였다.
- 2> 네오마이신 저항성 유전자를 얻기 위해 pEGFP-N1 벡터(Clontech)를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(서열번호 8)와 역방향 프라이머(서열번호 9)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.
- 3> 서열번호 8: 5' - GCGGCCGCGCGCGTCAGGTGGCAC - 3'
- 34> 서열번호 9: 5' - CGATCGGACGCTCAGTGGAACGAAACTC - 3'
- 35> 그 결과 얻은 1.9 Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 NotI 제한효소로 절단하여, 클로닝에 사용할 네오마이신 저항성 유전자 부분을 준비하였다.
- 56> 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터의 암피실린 저항성 유전자(ampicillin-resistance gene) 부위를 NotI과 SalI 제한효소로 절단하여 제거함으로써, 클로닝에 사용할 벡터를 준비하였다.
- 57> 상기와 같이 준비한 네오마이신 저항성 유전자와 벡터를 연결하여, 네오마이신 저항성 유전자가 기존의 pUP2/hEPO vector에 삽입된 pUP2/hEPO-Neo 벡터를 제조하였다.
- 158> 1-2) I/pUP2/hEPO 벡터의 제조
- 159> UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 안정적으로 발현할 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, 인슐레이터 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO-Neo 벡터에 도입하여 I/pUP2/hEPO 벡터를 제조하였다.
- 160> 인슐레이터 유전자는 닭(chicken)의 B-글로빈 유전자(B-globin) 인슐레이터 유전자가 포함되어 있는 pBC1 벡터(Invitrogen)를 주형으로 하고, 정방향 프라이머(서열번호 10)와 역방향

프라이머(서열번호 11)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였으며, PCR 효율을 높이기 위해 2 카피(copy)를 증폭하였다.

61> 서열번호 10: 5' - TCGACTCTAGAGGGACAG - 3'

62> 서열번호 11: 5' - CTCACTGACTCCGTCCT - 3'

163> 그 결과 얻은 2.4Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후 NotI 제한효소로 절단하여, 클로닝에 사용할 인슐레이터 유전자 부분을 준비하였다.

164> 상기와 같이 준비한 인슐레이터 유전자와 1-1)의 벡터를 NotI site로 연결하여, I/pUP2/hEPO 벡터(도 8)를 제조하였다.

165> 1-3) pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 제조

166> UPII 프로모터의 조절 하에 단백질을 대량으로 발현할 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, WPRE 유전자를 다음과 같이 pUP2/hEPO-Neo 벡터에 도입하여 pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 제조하였다.

167> WPRE 유전자를 클로닝하기 위해 정방향 프라이머(서열번호 12)와 역방향 프라이머(서열번호 13)를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다.

168> 서열번호 12: 5' - ACCAGGTTCTGTTCCTGTTAATCAACCTC - 3'

169> 서열번호 13: 5' - CTCGAGGAGCCCGAGGCGAAACAGGCG - 3'

170> 그 결과 얻은 0.6 Kb의 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 삽입한 후, 상기 실시예 2)에서 얻은 pUP2/hEPO-Neo의 NcoI 제한효소 위치에 다시 삽입하였다. 상기 벡터를 BspHI 제한효소로 절단하여 클로닝에 사용할 WPRE 유전자 부분을 준비하였다.

- 71> 한편 본 발명의 pUP2/hEPO 벡터의 EPO 유전자 뒤쪽을 NcoI 제한효소로 절단하여 클로닝에 사용할 벡터를 준비하였다.
- 72> 상기와 같이 준비한 WPRE 유전자와 벡터를 연결하여, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터(도 9)를 제조하였다.
- 73> 1-4) I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 제조
- 74> UPII 프로모터의 조절 하에 발현량의 극대화, 발현의 안정화 및 효율적인 세포주 구축을 모두 충족시킬 수 있는 발현 벡터를 얻기 위해, 다음과 같이 I/pUP2 /hEPO(WPRE) 벡터를 제조하였다.
- 175> 상기와 같이 1-2)에서 준비한 인슐레이터 유전자와 1-3)의 벡터를 NotI site로 연결하여 I/pUP2/hEPO 벡터(도 10)를 제조하였다.
- 176> 2) 본 발명의 발현 벡터들의 효율성 확인
- 177> 상기 실시예 6에서 제조한 발현 벡터들의 효율성을 다음과 같이 확인하였다.
- 178> 2-1) 본 발명의 발현 벡터들에 대한 PCR 분석
- 179> 본 발명의 발현 벡터들에 의한 EPO 유전자의 발현량을 확인하기 위해, 다음과 같이 실시한 PCR(real-time PCR)을 수행하였다.
- 180> 상기 실시예 6에서 제조한 본 발명의 발현 벡터 4종류를 형질도입키트(transfection Kit, Effectene, Qiagen)를 이용하여 방광 세포주 RT4에 도입한 후 계대배양을 거쳐 안정된 세

포라인(stable cell line)을 구축하였다. 각 세포주로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하여 PCR을 수행함으로써 형질도입 이 제대로 이루어졌음을 확인하였다.

81> EPO 유전자의 발현량을 확인하기 위해 4종류의 세포로부터 Total RNA를 뽑은 후 RT-PCR을 하여 cDNA를 증폭하였다. 상기 cDNA를 주형으로 하고 EPO의 엑손 부분을 증폭할수 있는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

82> 각각의 세포에서 발현량을 확인하기 위해 세포 내에서 일정량으로 발현되는 유전자(house keeping gene)인 GAPDH를 대조군으로 사용하여 3차례의 반복실험을 함께 수행하였으며, 결과는 통계프로그램인 SAS를 이용하여 통계처리하고 도 11에 나타내었다(pUP2: pUP2/hEPO 벡터, IUP2:I/pUP2/hEPO 벡터, PW:pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, IW:I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터).

183> 도 11에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현 벡터들은 pUP2/hEPO 벡터, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 순으로 높은 EPO 유전자 발현율을 보였다.

184> 특히 WPRE와 인슐레이터를 함께 포함하는 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터는 별도의 조절인자를 포함하지 않는 pUP2/hEPO 벡터에 비해 50배 정도 높은 발현율을 나타내었다(도 11b).

185> 따라서 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 비롯한 본 발명의 발현 벡터들은 EPO의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

186> 2-2) 본 발명의 발현 벡터들에 대한 웨스턴 분석

187> 본 발명의 발현 벡터들에 의한 EPO 단백질의 발현량을 확인하기 위해, 다음과 같이 웨스턴 분석을 수행하였다.

- 38> 상기 실시예 6의 2-1)에서 본 발명의 발현 벡터들을 각각 도입하여 구축한 세포주들을, NP-40이 포함된 용해 완충액(lysis buffer)에 넣고 초음파 처리하여 단백질을 추출하였다.
- 89> 각각 40 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 PVDF 막으로 전이시킨 후, EPO 항체를 처리하여 EPO 단백질 발현량을 확인하였다. EPO 단백질의 발현량을 정량하기 위해, 액틴(Actin)에 대한 항체를 대조군으로 사용하게 2차례의 반복실험을 함께 수행하였다. 결과는 통계프로그램인 SAS를 이용하여 통계처리하고 도 11에 나타내었다(pUP2: pUP2/hEPO 벡터, IUP2:I/pUP2/hEPO 벡터, PW:pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, IW:I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터).
- 90> 도 12에 나타난 바와 같이, 본 발명의 발현 벡터들은 pUP2/hEPO 벡터, I/pUP2/hEPO 벡터, pUP2/hEPO(WPRE) 벡터, I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터의 순으로 높은 EPO 단백질 발현율을 보였다.
- 191> 이러한 결과는 상기 실시예 7의 1)에서 나타난 결과와 일치하는 것이다.
- 192> 따라서 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터를 비롯한 본 발명의 발현 벡터들은 EPO의 생산에 유용하게 사용될 수 있다.
- 【발명의 효과】**
- 193> 본 발명의 프로모터는 방광 특이적인 목적단백질 발현을 유도하며, 기존의 방법에 비해 매우 높은 농도로 소변 중에 목적단백질을 발현한다.
- 194> 본 발명의 프로모터 및 그 조절을 받는 목적단백질로 이루어진 발현 벡터로 형질전환된 동물은 기존의 형질전환동물에 비해 훨씬 높은 효율로 소변 중에 목적단백질을 분비한다. 또한 본 발명의 형질전환동물로부터 얻은 단백질은 기존의 동종 단백질이 나타내는 것 이상의 우수한 생리활성을 나타낸다.

35> 따라서 본 발명의 프로모터, 이를 이용한 발현 벡터 및 형질전환동물은 의약학적으로 중요한 가치를 지닌 유용단백질의 생산 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 1의 구조를 갖는 돼지의 유로플라킨 II 유전자의 프로모터

<서열번호 1>

gggctaggagtggaatcagagctggcctatgccacagcaacgcagaatccaaaccacatctccgacctacaccagaccgtca
ccataacacaggatccttaaccactgagcaaggtcagggatcaaaccctcctcatggatactagtctgggttcttaaccgcgtga
gccacagtgggcactcctgtttttgtttgtgtcttcgttttttggtgcatctgcagcatacagaagttcctgggttaaggattgaac
ccatgccacagcagcaaccgagccacagcagtgacaacagcctgatccttaactgctagaccaccaggggaacgccccctcaactttt
catgccttggaaccctgagtcagtacaacctgacaatngntttttttttttttttttttgccttttctagggccacttcccgcggc
atgtggagattcgaggctanaggtctaatacgagctgtagccaccggcctacaccagagccatagcaacgagggatccgagccgagt
ctgcaacctacactacagctcatggcaacaccggatcgtaaccactgagcaaggccaggggatcgaaccgcaacctcatggttcc
tagtcagattcgtaaccactgcacatgacaggaactcccaacctgacaattttatcatttctgcaccctagttgttgagtaatttg
aaaaattccaagatgtcaaggtcagtgatggttaattttatgtgtcaacctgactaggccatgttgcccggatgtggagtcattg
ttattctggatgttactgtgaagatatgttttgatgaaattaacatttaaatcagtggggggaaaaaagaagttctcgttctggtg
catcagaaacaaatccgactaggaaacaagcggttgacaggttcgatccctggcctcacttagtggagtcaggatctggcgttgccgtg
agctgtggtacaggtggcagatgcagctcggatctagcattgctgtggctgtggtgtaggccagcagctgtagctctgattaaacccc
aagtctgggaacctccatatgccgtgggtgtggccgaaaaagcaaaaaataaataaataaataaatttaaccaggggattttgagc
aaagcagattaccccataatatgggtgggtctcatcaagttcattgtaggccctagtggaaacaagaccgacctccaccttctcccca
tgagaaggaaagaattctgcaaaaagaccgccttnggacntaaactgcaactctttcctgagtttccagcatgttggcctccccatc
agactttggacttgccaagcctccgcaattgcatgagccaattccttaaaataaatccgtctatatatacacatcctgttggttctgt

ttctccagagaaccctgactaacgcagctctgcacccctgaagaccagtggtccccacactcagctgggtgtcacctccaaacactcag
ccttctcaaggctctttctagctgtgtcctcctctccccacaacagctgtttcaaactctcacccctcttcagggcgcaatcccttc
tcctccctgagtttctacttcccagagaaagcagagaccttcaggagtgtgctgccttaacttacttcttcatccctcagccttgc
aaaagtataagctttctctgcaccactgcccattcttctctctgcagacagggtcattcctaaagccaaacgctaatagcctccacct
ctgatctgagtcccatcttttccctcctccagaagcttctcataaattctacccccctttcttcttattctttatctttgaaaacaa
aatggaagacagccttcccgttgtggtgcagcggaacagtggtgccttggaagcgctgggacgcaggttcgacccctggcccagcat
agtaggttaaggatccagtgttgccacagttttggcttagattgaaactgcagctcagatctggtccctggcctgggaacttcatacg
ccacaggacggcccaaaaagaaaagaaagaaaaataaaaaacaaaacagaaaagcctttcctgtacccccaattccctccagttatc
tctctctttcccttcccagccaagctctgcaaagagcggctctgcacagttctaactctacctcctcccagttggccctggactttctc
agtctggcttctacccccctcacccgtaggaatctgctctgaaggacacgcacccctcacgatccttgggccaggacattttttgta
ccagcctttcaatcctgaccttcataatcatccgacacctcctttgtgaaaccctccatccactttctcctggttcccctcctaagacc
cattccgccttcttcagccccctccctccatctgtcctttagatgccgcattttcctagtatcctgtcctgcgcggnctcgtccttccc
ttccacaactctcttcaaggactcttttctccatgtgcgattttgcccatggcccaccttccctctctttaccagactttccccgg
tgctccagactcatagactcaattatgaaaacatagttttcatctgatttgcccaagatatgtgattagttattactgtataacagc
ttatccccaatttagtggttataaaaataaacacttattctgagaatcagaaacctaggcaggacatagttggggctctcatgaagtt
gcactgaaaatgtcccctgggctaatacatcgaggactgacc

agggctggaggatctgttccaagctcattcattcacatggccgtagggtggagacagctcttctctggatcttggcaggagcctcaat
tccttgtcacgtggacctccccttggaggggggtcccatgtcctccatggtagtaatccatgagagcaaggtggaaggtgccatgcca
tttaggacctagcctcaggaggacctaagtcacttctgttgtagtctgttggccacacagactaacctgacacaatgcacccatcc
atgacctgctgccagtcattctccacactgtttccagaatgatattacataagtaaaactcctcaaaggcttttgagattttttt
cccattatagttgatttataacctcagaggcttttgttttcttcagcataaaaaaccaagttccttaacatagcatgtaaccactggc
caccctgccagtggctagaactctcaccatgtccatccttgaatactgctttctagccaagagctattgtttgcagttcccagaatgt
gtcgggataaactcacatctctgagccttttcatgtgctgttcctcactttggaatatccccttccatttaggaaggctaattgtccat
tcatintccaaaactcagaagcaaattttttttttttttttttttttttttttttgcttttagggccgaactctcagcatatggagg
ttcccaggttagccatcaaattggaattgttagctgctggcctacaccacagccatagcaacaccagacccaagtcacatctgcaacct
acatcacagatcatggcaatactggatccttaaccactgagttagcccagggtcaaacacaaattctcatggatactcgccaggtt
cattaccactgagccacaacaggaactcctctcctttttatggtcacacctgcagcatatggaagttcctgggccagggttgaatct
gagtggcagctgtgacaatgccgtatcctttaattcactgtgctgggctgaggggntaaantgcccctcctaaaaaacctgagctgct
gcagttggattcttaatccactgcaccacaagggggaaggtcaagaactgtcttgccatctctgtatcttatcacctagcatagtacc
caccatagagaagttgctcaacaaatgtttactgaatgaataaatgcatgagctggagttccattgcggtcagcagtaacaaacct
gactagcattcataagaacttgggttcgatccctagcctcagtgggttaaggatgcagcattgctgtgagctgtgggttaggtcgag
acgacactcagatcccacattgctgtcactgtggcgcaggccggcctctgtagctctgattcgactcctagcctgggaacgtccatat
gccacaggtgaggccctaaaaagaaataaataagcaagcaagtaagcaagcaggcagtttcttggtgccttgtaccctgtggcctgt
gtggtatacaagtaacagctgatccatgtctcagtcattgtttcc

ccctcagactacctttcctgccccatctctccctttgacataaattggaaaaacaaattcagaattttgtcccactacctttcttgcta
gctctgtggccttgggaaagctatttattgcctctgagcctctaattttcatctgcaccaaggattaataaaaaggagaggataagat
gaattacttatattaataatttattgaaccagatactgtgctaggcactcttaaataaattagcttgagtgatagtcatagtatcctgg
tgagacagatttttttttcccttttatggttgacgtgcaacatatggaagttcctgggctggggtcgaattggagctgcaggtgctt
gcctatgccacagccatggcaacatcatatacaaaccgcacctgtgacctacaccacagattgcagcaacgctggatccttcacccaa
ggagcaaggccaggaatcaaatgtgcatcctcaciaacactatgtccggttttaacccgctgagccacaccaggaactccatggcga
gacagattttatactctgtctacagaagaggaaagtgaagctcagaatggttaggtaggtaacttggccaagatcaaaaaattcaaag
aagatttggggcaagtggatgatcatggcagcattagaaaaaataaagaagcatccacttgttttccaacactgaacaactgagatt
ttcttactctcacagctttttccagcttcatatccaaggacagacgctctgccattttcccatcagaccaatatttgctgaacactgc
acctttacttttaggtccaagtcaccaggggttttcccagtttgctcctacagattctgacactatctccacatttttttgcacctt
tattttaagcatttttatacctgtcataccttgctagataaatgggaaggaatgaatcttccatttataggtgagaaaattgaggt
tcaaagtgactcaccaaaagtcatatagcatcactcctcaacaggaggacagcagtcaccaccagagggtaacatgtccatggagcct
agtgagacacatttttctaactgactgggaagcagcagagtggtattgtgaagggggaatcataggtatatcaaacagacttaggttct
gatccgagctattctgcttgcaaacaacatagttcaatttaaaaaaaaaaagaaagaaagaaagaaagaaaggagcccccatcctg
gtgcagtggaaacaaattcaactaggaactgtgaggttggtgggttcgatccctggccttgctcagtggggttaaggatctggcgttgcc
atgagccgtggtgtaggttgacagactcaactcagatctggcgttgctgtgactgtggctgtgatgtaggctggcagctgtaactccgg
ttagaccccagcctgggaacctccatatgcaacctccatatgcggtgggtgtggccctaaaaagaaaaaaaaaaaaaaaaagaggaatt
cccttatggctcagcaggttaaggatctggattgtcactgctg

tggctctagttacagccatagtgaggttcaatccctggcccaggaacgtctgcatcccacaggtgtggccaaaaaagaaagaaagga
aggagttctgttggcacaataggattggcaacatcttaggagtactgggacacaggttcaatccctggcccagcacagtgggt aag
gagccagtggtgctgggtcaaaaaagaaaagaaaaagtaccatagttagagtaaatctgttttaggagctattctttggggcagaacag
agagatcaggagctccttgagagcagaaacttacctttacatccctcgtgcctagcacggttctaggggcatacctggtatttaataa
atatagccaactggataggggattggaaggaaagagcaggggaggggaacttgagtgagttgaaaaattgagaatccaaaggggagaca
gcctagaaagagtaggtccaagaaagagatcccaggcatctgtggccctggttccctttttccaagccatgaggaaatcctcagagga
acagagtgtgtggctttaaatgacttcagcgttgtcaatgaatctgctcggctaaaagagttatcctcttgctccttcgcttgtcct
ccccctcctctcagctcccaaacccttctcggctgctgtgatgggataattagatgcgagagctcagcacagatgatgctccagttg
cctagcaactaatggtttccatggagaccgcaaagcacagcctccagagcagccagtgagcagctcggcagggcagggagaagacgca
actctcagctcctccagaaacctggggagggccaggagtggggaagaagggggggatcggagggcttaaggcacaggcccctcttat
cctcttaaaatctggtcagagctctgccctcccctcccctactctgtcccactcataatttcagatggagttgggggcttaggagtgg
accaacacaacctaccctgcaataaaccacaaccttctttctgcttctggtttgtggctgaaaatggnaaaagaaatctccaagtgc
aagtgtaaacancntcctgggttggcaatgggatctgaagagtactaagatccctcagacctggaattccaccatttagtctttccct
ctctccaaagttctcaatgtgcaaaagatcctctttcagtttgagagcaatgataggatcttctaaaaggagacaaaagccaagtg
caggaaaaatagaattcagttcttcacccaaaggcagcctgtcctgggagacaggggtgaaacacttggtcctgatctccatcagagg
atccagagtgtgtgtgtttgttgctggggagggggacacaatatagagcatctggtgactcaaagtatgtgcctccagagtagcatc
aatcaatgttacctggaagcttggttagaaatgcagaatttcaggcttcacctcagacccactgaatcagaaactgcatttaacaaga
tcctcatgattcatacgcacattaaatttggagaagcgctgac

ctgagacctcctcctctctgcttgggcccatagttctacctttattgtcacctcgtctcacctcgtgctcataccccaggctttgag
cctaccttccccccatggggaaaggacaçaaggccaccagccccctcacttcctaccaggacctggccctcctctgggactggaga
aggacaaagaggacccccctctgtggaggtctacgacctctcctgaccaagtagtccactcaccacaagtggctctacctctctgagtc
tcagtttccacatccacaaaaggtggccaatgctatctgccaccagaatggctgtgagggtggagcaggcaaagcctctgtgccatc
agagaaattgtgtctctttttcattttctcccagtgggtttctttctcgtctttattcttttttttttttttttttctgtctgttgt
attttagggccgtgcctgtggcatacgggaagttcccagggtagggtccaatgggagctgtagccccgggcctacgccacagccaca
gcaatgtgggatctgagccacgtctgcaacctacaccacagctcacggcaacaccagatccttaaccactgagcaaggccagggatc
gagccacgtcctcatggatgctagttgggttcgttaaccgctgagccatgatgataactcctctttctattcttttagtcacaaacag
tcaacaaaggttgctgaccaaggctgatcgtgccacccccagccccagactgggccagtgccaccaccttgggtctctctggaa
atcctgccagcatcaattggctccactctccaggaggatgggaagccctgtggccctgggactcacaccctctgcatctcccaga
gtgcaggacctgggtcttcaggagacaccaagaactggctccccggctctgctgccccaccacctactaccagtttctctccattc
ctgccagtccaggccccctggggttactctcctctctctgtacaccagtgcacacctcagaacctgcttcctcctgggaacaccac
taccacgtgggagaaggggtcgtctaggggttgggcccagatacacttgtaaagcaggaacacacgagcccttacatgtgggtgtccc
ggaagaagggggttttccacccccgcttttagtcacctgcccctctgcagctgcctgagccaccaagaccagccaaggtctcctgc
cttctggcctgagggccagctccccatcctgaaaaacctgtctgggggcctcccctgaggctgtagggcccaaggcctcccctgaggc
tgtagggcccaaggggcaggttgaacaggattcccctctggccctcctacccccaggacaaaaccagagccccaggacagggcctca
cttgcctcaggaaaccacagcttgccagcaccagcccagcaccagcccagct

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열에 하나 이상의 붕괴, 결실, 삽입, 점, 치환, 논센스, 미스센스, 다형현상, 재배열 돌연변이가 일어난 기능적 등가물 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 유로플라킨 II 프로모터

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항의 프로모터 염기서열 및 그 3' 쪽으로 목적단백질을 암호화하는 염기서열을 포함함을 특징으로 하는 발현 벡터

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 목적단백질은 인간 EPO(erythropoietin)임을 특징으로 하는 발현 벡터

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 기탁번호 KCTC 10352BP로 기탁된 발현 벡터 pUP2/hEPO

【청구항 6】

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자(selective marker)로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자(neomycin-resistant gene)를 포함하며, UP2 프로모터의 5' 쪽에 서열번호 6의 인슐레이터(insulator)를 포함함을 특징으로 하는 I/pUP2/hEPO 벡터

<서열번호 5>

```
gcggccgcgcgcgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctatttggtttattttctaaatacattcaa  
atgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagagt cctgaggcggaagaaccagctgtg  
gaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcagaagt
```


atgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccagggtgtggaaagtcagggtcccgagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatc
tcaattagtcagcaaccatagtcggccctaaactccgcccataccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgcccattgg
ctgactaattttttttatgagaggccgaggccgctcgccctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggc
ctaggcttttgcaaagatcgatcaagagacaggatgaggatcggttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggcc
gcttgggtggagaggctattccggtatgactgggcacacagacaatcggtgctctgatgccgccgtgtccggctgtcagcgcagg
ggcggccggttcttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaagacgaggcagcggctatcgtggctggccac
gacggcggttcttgcgcagctgtgctcgacctgtcactgaagcgggaaggactggctgctattggcggaagtgccggggcaggat
ctcctgtcatctcaccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgccggcggtgcatacgcttgatccggctacct
gcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggtggaagccggtcttgtcgatcaggatgatctggacga
agagcatcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgagcatgccgacggcgaggatctcgtcgtgacccatggc
gatgcctgcttgccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaccgctatc
aggacatagcgttggctacccgtgatattgctgaagagcttggcggaatgggctgaccgcttctcgtgctttacggtatcgccgc
tccgattcgagcgcacgccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaaatgaccgaccaagcga
cgcccaacctgccatcacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttccgggacgccggctg
gatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgccaccctagggggaggctaactgaaacacggaaggagacaataccg
gaaggaacccgcgctatgacggcaataaaaagacagaataaaacgcacgggtgttgggtcgtttgttcataaacgcggggttcggtccc
agggttggcactctgtcgataccccaccgagacccattggggccaatacgcccgctttcttctttccccaccccccccccaag
ttcggtgaaggccagggtcgagccaacgtcggggcggcag
gccctgccatagcctcaggttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcct
ttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgtccgatcg

<서열번호 7>

tgcactctagaggacagcccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctccccgctaggggcagcagcgagccg
ccccggggctccgctccggtccggcgctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagccccgggcacggggaaggtggcacg
ggatcgctttcctctgaacgcttctcgctgctctttgagcctgcagacacctggggggatcacggggaaaaagctttaggctgaaagag
agatttagaatgacagaatcatagaacggcctgggttgcaaaggagcacagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggt
catcaaccagcagcccaggctgccagagccacatccagcctggccttgaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggc
aacctgttcagtgcgtcaccacctctgggggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccatt
cccccttgtcctatcaagggggagtttgctgtgacattgttggcttgggggtgacacatgtttgccaattcagtgcacacggagaggc
agatcttggggataaggaagtgcaggacagcatggacgtgggacatgcagggtgttgagggtctgggacactctccaagtacacagct
tcagaacagccttaaggataagaagataggatagaaggacaaagagcaagttaaaaccagcatggagaggagcacaaaaaggccaca
gacactgctgggtccctgtgtctgagcctgcatgtttgatgggtgtctggatgcaagcagaaggggtggaagagcttgcctggagagata
cagctgggtcagtaggactgggacaggcagctggagaattgccatgtagatgttcatacaatcgtcaaatacatgaaggctggaaagcc
tccaagatccccaagaccaacccaacccacccaccgtgccactggccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacc
tccagggacggtgacccccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcaccgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagc
ccgaccctcccctggcacaacgtaaggccattatctctcatccaactccaggacggagtcagtgaggatggggctctagagggacagc
cccccccaaagccccagggatgtaattacgtccctccccgctaggggcagcagcgagccgccccggggctccgctccggtccggcg
ctcccccgcatccccgagccggcagcgtgcggggacagccccgggcacggggaaggtggcacgggatcgctttcctctgaacgcttct
cgctgctctttgagcctgcagacacctggggggatcacggggaaaaagctttaggctgaaagagagatttagaatgacagaatcataga
acggcctgggttgcaaaggagcacagtgtcatccagatccaacccctgctatgtgcagggtcatcaaccagcagcccaggctgcc
agagccacatccagcctggccttgaatgcctgcagggatggggcatccacagcctccttgggcaacctgttcagtgcgtcaccacct
ctgggggaaaaactgcctcctcatatccaacccaaacctcccctgtctcagtgtaaagccattcccccttgtcctatcaagggggagt

ttgctgtgacattgttgggtctgggggtgacacatgtttgccaattcagtgcatcacggagaggcagatcttggggataaggaagtgcag
gacagcatggacgtgggacatgcaggtgttgagggtctgggacactctccaagtcacagcgttcagaacagccttaaggataagaag
ataggatagaaggacaaagagcaagttaaaaccagcatggagaggagcacaaaaaggccacagacactgctggtccctgtgtctgag
cctgcatgtttgatgggtgtctggatgcaagcagaaggggtccatgtccctcagtgccacatccccacagttcttcatcacctccaggg
acggtgacccccccacctccgtgggcagctgtgccactgcagcaccgctctttggagaaggtaaatcttgctaaatccagcccgaccc
tcccctggcacaacgtaaggccattatctctcatccaactccaggaacggagt cagt gag

【청구항 7】

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자를 포
함하며, EPO 유전자의 3' 쪽에 서열번호 7의 WPRE(woodchuck hepatitis virus
posttranscriptional regulatory element)를 포함함을 특징으로 하는 pUP2/hEPO(WPRE) 벡터

<서열번호 7>

accaggttctgttcctgttaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggattcttaactatgttgctcct
tttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaat
cctgggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccac
tggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcc
tgccttgcccgtgctggacaggggctcggtgttgggcactgacaattccgtgggtgtgtcggggaagctgacgtcctttccatggc
tgctcgctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccg
cggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgcct
gtttcgctcgggctcctcgag

【청구항 8】

제 4항에 있어서, 선택적 표지 유전자로 서열번호 5의 네오마이신 저항성 유전자를 포함하며, UP2 프로모터의 5' 쪽에 서열번호 6의 인슐레이터를 포함하고, EPO 유전자의 3' 쪽에 서열번호 7의 WPRE를 포함함을 특징으로 하는 I/pUP2/hEPO(WPRE) 벡터

【청구항 9】

제 3항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물 수정란

【청구항 10】

제 9항의 수정란을 이식시켜 얻음을 특징으로 하는 형질전환동물

【청구항 11】

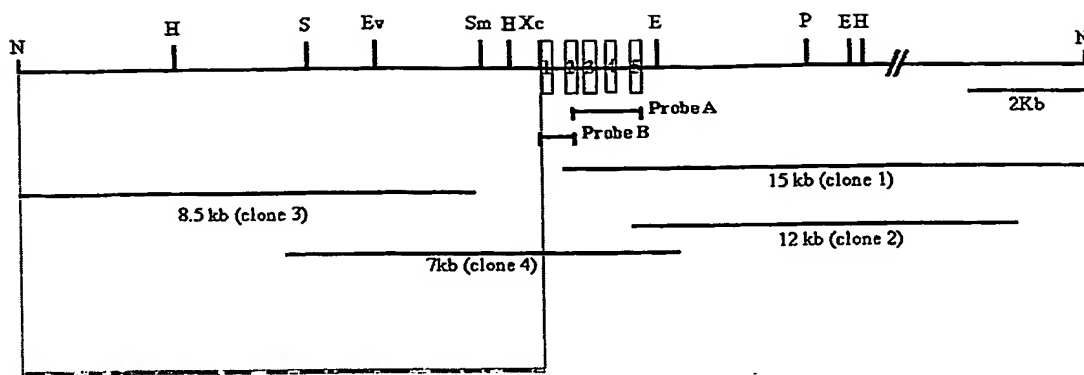
제 10항에 있어서, 돼지, 생쥐, 소, 닭, 양 또는 염소 중 선택된 하나임을 특징으로 하는 형질전환동물

【청구항 12】

제 3항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 도입시킨 동물 수정란을 대리모 동물에 이식하고, 상기 대리모 동물로부터 형질전환동물을 얻고, 상기 형질전환동물의 소변으로부터 유용단백질을 분리·정제하는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 유용단백질의 제조 방법

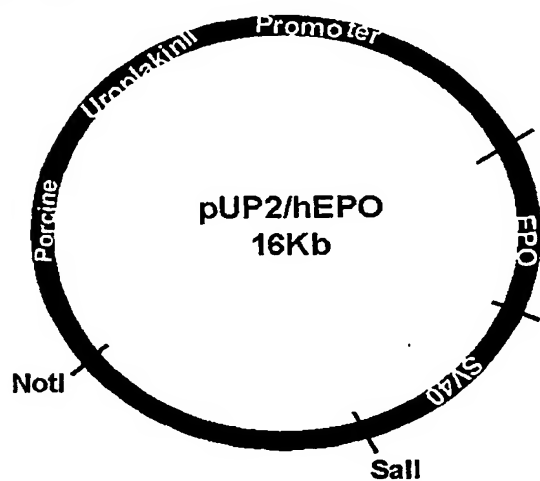
【도면】

【도 1】



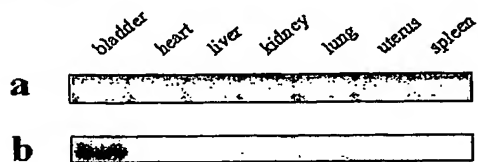
Porcine UPII promoter : 8847kb

【도 2】



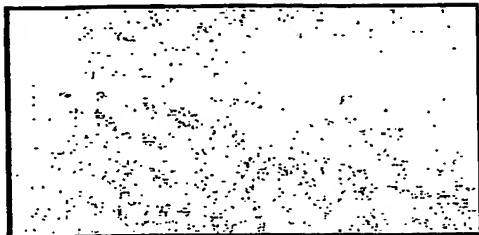
pUP2/hEPO Expression Vector

【도 3】

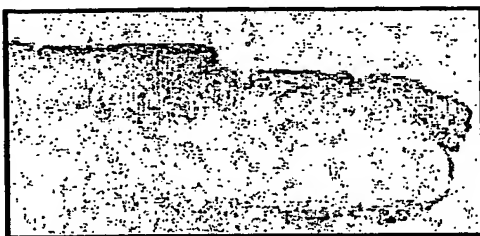


【도 4】

a

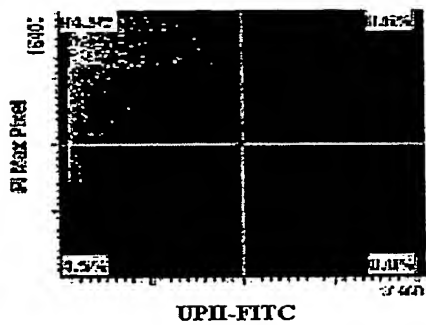


b

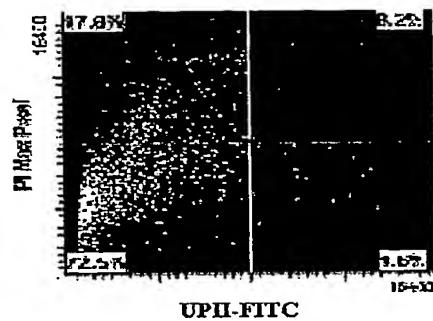


【도 5】

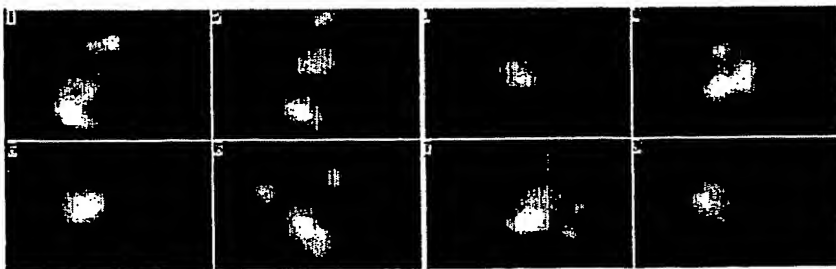
a



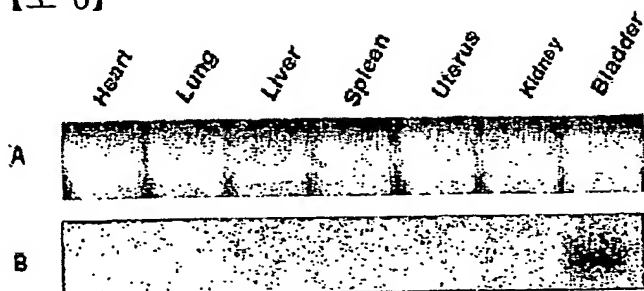
b



c

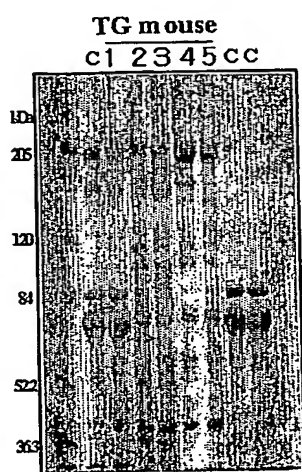


【도 6】

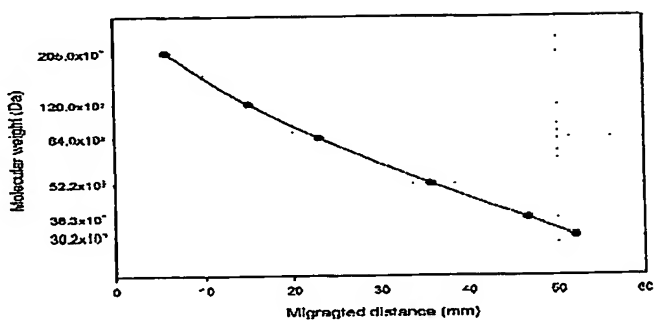


【도 7】

a



Separation of protein by SDS-PAGE (7.5%)



$$y = a \cdot \exp(-bx) + c \cdot \exp(-dx)$$

$$a: 496508.9$$

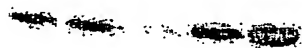
$$b: 0.1695$$

$$c: 191863.3$$

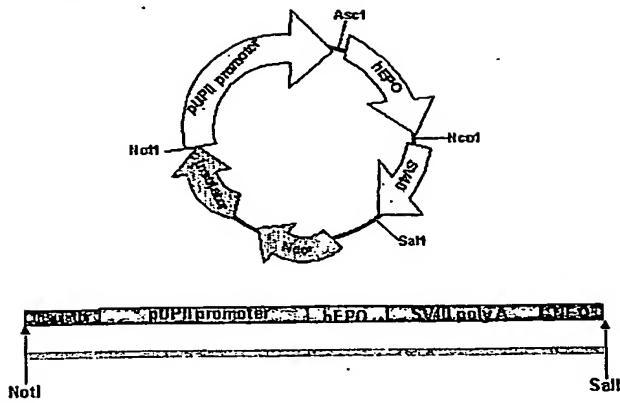
$$d: 0.0262$$

b

C 1 2 3 4 5 C

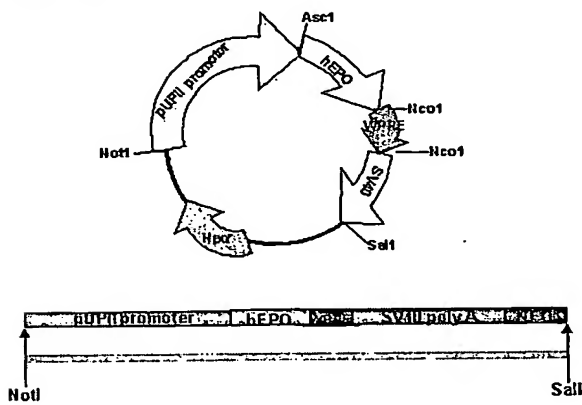


【도 8】



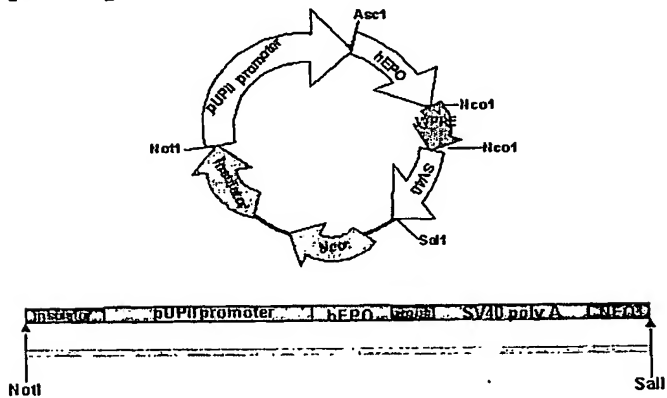
I/pUPII/hEPO (IUP2)

【도 9】



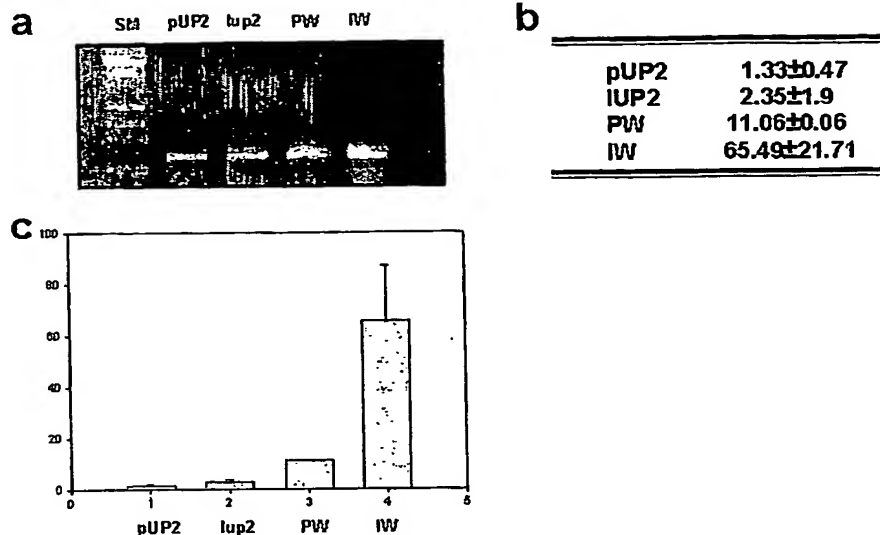
pUPII/hEPO/WPRE (PW)

【도 10】

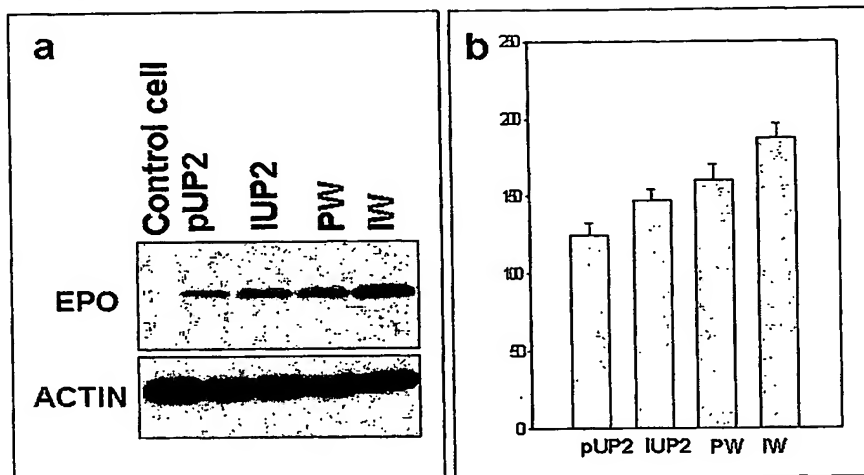


I/pUPII/hEPO/WPRE (IW)

【도 11】



【도 12】



【서열목록】

<110> CHO-A PHARM CO., LTD.

KIM, Jin Hoi <120> Porcine uroplakin II

promoter and the production method of useful

proteins using said promoter <

130> 03P-142 <150>

PCT/KR 1020020067856 <151>

2002-11-04 <160>

13 <170>

KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 8847 <212> DNA <213> Sus scrofa <220>
 <221> promoter <222> (1)..(8847) <223> porcine uroplakin II promoter <400>

```

1 gggctaggag tggaatcaga gctggcctat gccacagcaa cgcagaatcc aaaccacatc      60
tccgacctac accagaccgt caccataaca caggatcctt aaccactga gcaaggtcag      120
ggatcaaacc caaatcctca tggatactag tcggttctt aaccgctga gccacagtgg      180
gcactcctgt tttgtttgt gtcttcgttt ttggctgca tctgcagcat acagaagttc      240
ctgggttaag gattgaacct atgccacagc agcaaccga gccacagcag tgacaacagc      300
ctgaccta actgctagac caccaggga cgcacctca actttcatg ccttggaac      360
cctgagtcag tacaacctga caatngnttt ttttttttt ttttttgcc ttttctaggg      420
ccacttcccg cggcatgtgg agattcgcag gctanaggtc taatcggagc ttagccacc      480
ggcctacacc agagccatag caacgaggga tccgagccga gtctgcaacc tacactacag      540
ctcatggcaa caccgcatcg ttaaccact gagcaaggcc aggggatcga acccgcaacc      600
tcatggttcc tagtcagatt cgtaaccac tgcacatga caggaactcc caacctgaca      660
atztatcat ttctgcacc tagttgtga gtaattigaa aaattccaa gatgtcaagg      720
tcagtgtgat ggttaatatt atgtgtcaac ctgactagc catgttgccc ggatgtggag      780
tcattgttat tctggatgtt actgtgaaga tatgttttg atgaaattaa catttaaact      840
agtgggggga aaaaaagaag ttctcgttct ggtgcatcag aaacaaatcc gactaggaaa      900
caagcgttg caggttcgat ccctggcctc acttagtgga gtcaggatct ggcgttgccc      960
tgagctgtgg tacaggtggc agatgcagct cggatctagc attgctgtgg ctgtggtgta     1020
ggccagcagc ttagctctg attaaacccc aagtctggga acctccatat gccgtgggtg     1080
tgcccgaaa aagcaaaaaa taaataaata aataaattta aaccaggga ttttgagcaa     1140

```

agcagattac cccataatat ggggtgggtct catcaagttc attgtaggcc ctagtggaac	1200
aaagaccgac ctccaccttc tccccatgag aaggaaagaa ttctgccaaa agaccgcctt	1260
nggacntaaa ctgcaactct ttcttgagtt tccagcatgt tggcctcccc catcagactt	1320
tggacttgcc aagcctccgc aattgcatga gccaatcct taaaataaat ccgtctatat	1380
atacacatcc tgttggttct gtttctccag agaaccctga ctaacgcagt ctgcaccctt	1440
gaagaccagt ggtccccaca ctacgtggg tgtcacctcc aaacactcag ctttctcaa	1500
ggctctttct agctgtgtcc tctctcccc acaacagctg tttcaaactc tcaccctct	1560
tcagggcgca atcccttctc ctccctgagt ttctacttc ccagagaaag cagagacctt	1620
caggagtgtg ctgccttaac ttacttcctt catccctcag ccttgcaaaa gtataagctt	1680
tctctgcacc actgccccat tcttctctc gcagacaggg tcattcctaa agccaaacgc	1740
taatgcctcc acctctgac tgagtcccat cttttccctc ctccagaagc ttctcataa	1800
attctacccc cttttcttcc ttatctttat ctttgaaaac aaaatggaag acagccttcc	1860
cgttgtgtg cagcggaaac agtgggtgcct tggaagcgct gggacgcagg ttcgaccct	1920
ggcccagcat agtaggttaa ggatccagt ttgccacagt tttggcttag attgaaactg	1980
cagctcagat ctggtcctg gcctgggaac ttcatacgcc acaggacggc caaaaagaa	2040
aagaaagaaa aaataaaaaa caaacagaa aagcctttcc tgtaccccca attccctcca	2100
gttatctctc tctttccctt cccagccaag ctctgcaaag agcggctcgc acagttctaa	2160
ctctacctcc tcccagttgg ccctggactt tctcagctg gcttctacce cctcacccg	2220
taggaatctg ctctgaagga cagcaccccc tcacgatcct tggcccaggg acattttttg	2280
taccagcctt tcaatcctga cttcatatc atccgacacc tcctttgtga aaccctccat	2340
ccactttctc ctggttcccc tcttaagacc cattccgcct tcttcagccc cctccctcca	2400

tctgtccttt agatgccga tttcctagta tctgtcctg cgcggnctcg tccttcctt	2460
ccacaactct cttaaggac tctttctcc atgtgcgatt ttgccatgg cccaccttc	2520
ctctctttac ccagactttc ccccggtgct ccagactcat agactcaatt atgaaaacat	2580
agttttcatc tgatttgccc aagatatttg cattagttat tactgtataa cagcttatcc	2640
cccaatttag tggcttataa aataaacact tattctgaga atcagaaacc taggcaggac	2700
atagttgggg tctcatgaag ttgactgaa aatgtcccc tgggctaac atacggagga	2760
ctgaccaggg ctggaggatc tgtccaagc tcattcattc acatggccgt aggttgaga	2820
cagctcttct ctggatcttg gcaggagcct caattccttg tcacgtggac ctccccttg	2880
agggggtccc atgtcctcca tggtagtaa tccatgagag caaggtggaa ggtgccatgc	2940
catttaggac ctagcctcag gagggaccta cgtcacttct gttgtagtct gttggccaca	3000
cagactaacc ctgacacaat gcacccatcc atgacctgct gccagtccat tctccacact	3060
gtttccagaa tgataattac ataagtaaaa ctctcaaag gcttttgaga tttttttcc	3120
cattatagtt gatttataac ctgagaggct tttgttttct tcagcataaa aaccaagttc	3180
cttaacatag catgtaacc actggccacc ctgccagtgg ctagaactct caccatgtcc	3240
atccttgaat actgctttct agccaagagc tattgtttgc agttcccaga atgtgtcggg	3300
ataactcaca tctctgagcc tttcatgtg ctgttccctc actttggaat atccccttc	3360
atttaggaag gctaattgcc attcatntc caaaactcag aagcaaattt tttttttt	3420
ttttttttt ttttttgct ttttagggcc gaactctcag catatggagg ttcccaggtt	3480
agccatcaaa ttggaattgt agctgctggc ctacaccaca gccatagcaa caccagacc	3540
aagtcacatc tgcaacctac atcacagatc atggcaatac tggatcctta accactgag	3600
tgagcccagg gatcaaacac aaattctcat ggatactgc caggttcatt accactgagc	3660

cacaacagga actcctctcc tttttatggc cacacctgca gcatatggaa gttcctgggc	3720
cagggattga atctgagtgg cagctgtgac aatgccgtat cctttaattc actgtgctgg	3780
gctgaggggn taaantgccc ctccataaaaa acctgagctg ctgcagttgg attcttaatc	3840
cactgcacca caagggggaa ggtcaagaac tgtcttgcca tctctgtatc ttatcaccta	3900
gcatagtacc caccatagag aagttgctca acaaatgttt actgaatgaa taaatgcatg	3960
agctggagtt cccattgcgg ctgagcagta acaaacctga ctagcattca taagaacttg	4020
ggttcgatcc ctgacctcag tgggttaagg atgcagcatt gctgtgagct gtggtgtagg	4080
tgcgagacga cactcagatc ccacattgct gtcactgtgg cgcaggccgg cctctgtagc	4140
tctgattcga ctctagcct gggaacgtcc atatgccaca ggtgaggccc taaaaagaaa	4200
taaataagca agcaagtaag caagcaggca gtttcttggc gccttgtacc cctgtggcct	4260
gtgtggtata caagtaacag ctgatccatg tctcagtcac gtttcccct cagactacct	4320
ttcctgcccc atctctccct ttgacataat tggaaaaaca aattcagaat tttgtccac	4380
tacctttctt gctagctctg tggccttggg aaagctatit attgcctctg agcctcta	4440
tttcatctgc accaaggatt aataaaaagg agaggataag atgaattact tatattaata	4500
tttattgaac cagatactgt gctaggcact cttaaataaa ttagcttgag tgatagtcac	4560
agtatcctgg tgagacagat ttttttttc cttttatggc tgcacgtgca acataggaa	4620
gttcctgggc tggggtcgaa ttggagctgc aggtgcttgc ctatgccaca gccatggcaa	4680
catcatatac aaaccgcacc tgtgacctac accacagatt gcagcaacgc tggatccttc	4740
accaaggag caaggccagg aatcaaatgt gcatcctcac aaacactatg tccggttttt	4800
aaccgctga gccacaccag gaactccatg gcgagacaga tttatactc tgtctacaga	4860
agaggaaagt gaagctcaga atggttaggc aggttaactg gccaagatca aaaaattcaa	4920

agaagatttg gggcaagtgg tgatatcatg gcagcattag aaaaaataaa gaagcatcca	4980
cttgttttcc aacactgaac aactgagatt ttcttactct cacagctttt tccagcttca	5040
tatccaagga cagacgctct gccattttcc catcagacca atatttgctg aacactgcac	5100
ctttactttt aggtccaagt caccaggggt tticccagtt tgctcctaca gattctgaca	5160
ctatctccac attttttttg cacctttatt ttaaagcatt ttitacacctg tcataccttg	5220
ctagataaat gggaaggaat gaatcttccc atttataggt gagaaaattg aggttcaaag	5280
tgactcacca aaagtcatat agcatcactc ctcaacagga ggacagcagt ccccaccaga	5340
gggtaacatg tccatggagc ctagtggaca catttttcta actgactggg aagcagcaga	5400
gtggtattgt gaagggggaa tcataggtat atcaaacaga cttaggttct gatccgagct	5460
attctgcttg caaacaacca tagttcaatt taaaaaaaa aaagaaagaa agaaagaaag	5520
aaaggagccc ccatcctggg gcagtggaaa caaatcaac taggaactgt gaggttgttg	5580
gttcgatccc tggccttgct cagtgggtta aggatctggc gttgccatga gccgtgggtg	5640
aggttgcaga ctcaactcag atctggcggt gctgtgactg tggctgtgat gtaggctggc	5700
agctgtaact ccggttagac ccagcctgg gaacctccat atgcaacctc catatgcggt	5760
gggtgtggcc ctaaaaagaa aaaaaaaaaa aaaagaggaa ttcccttatg gctcagcagg	5820
ttaaggatct ggtattgtca ctgctgtggc tctagttaca gccatagtgc aggttcaatc	5880
cctggcccag gaacgtctgc atcccacagg tgtggccaaa aaagaaagaa aggaaggagt	5940
tctgttgttg cacaatagga ttggcaacat cttaggagta ctgggacaca ggttcaatcc	6000
ctggcccagc acagtgggta aggagccagt gttgctggtc aaaaaagaaa agaaaaagta	6060
ccatagttag agtaaatctg ttttaggagc tattcttttg ggcagaacag agagatcagg	6120
agctccttga gagcagaaac ttacctttac atccctcgtg cctagcacgg ttctaggggc	6180

atacctggta tttataaat atagccaact ggatagggga ttggaaggaa agagcagggg	6240
agggaaacttg agtgagtga aaaattgaga atccaaaggg gagacagcct agaaagagta	6300
ggtccaagaa agagatccca ggcattitgt gccctggttc cttttttcca agccatgagg	6360
aaatcctcag aggaacagag tgctgtggct ttaaattgact tcagcgttgt caatgaatct	6420
gctcggctaa aagagttatc ctcttgctcc ttgccttgct cttccccctcc tctcagctcc	6480
ccaaaccctt ctctggctgct gtgatgggat aattagatgc gagagctcag cacagatgat	6540
gctccagttg cctagcaact aatggtttcc atggagaccg caaagcacag cctccagagc	6600
agccagttag cagctcggca gggcagggag aagacgcaac tctcagctcc tccagaaacc	6660
tggggagggc caggagtggg gaagaagggg gggatcggag ggcttaaagg cacaggcccc	6720
tcttatcctc ttaaaatctg gtcagagctc tgccctccc tcccctactc tgtcccactc	6780
ataatttcag atggagttgg gggcttagga gtggaccaa cacaacctac cctgcaataa	6840
acccaacctt ctttctgctt ctggtttgtg gctgaaaatg gnaaaagaaa tctcccaagt	6900
gcaagtgtaa acancttctt gggttggcaa tgggatctga agagtactaa gatccctcag	6960
acctggaatt ccaccattta gtctttccct ctctccaaag ttctcaatgt gcaaaagatc	7020
ctctttcagt ttgcagagca atgataggat ctcttaaaag gagacaaaag ccaagggtgca	7080
ggaaaaatag aattcagttc ttcacccaaa ggcagcctgt cctgggagac aggggtgaaa	7140
cacttgggtc tgatctccat cagaggatcc agagtgtgtg tgtttgttgc tggggagggg	7200
gacacaatat agagcatctg gtgactcaaa gtatgtgcct cccagagtag catcaatcaa	7260
tgttacctgg aagcttgta gaaatgcaga atttcaggct tcacctcaga cccactgaat	7320
cagaaactgc atcttaacaa gatccctcat gattcatacg cacattaaat ttggagaagc	7380
gctgacctga gacctcctc ctctctgctt gggcccatag ttctacctt attgtcacct	7440

cgctcacct cgtgctcata ccccaggctt tgagcctacc ctcccccca tggggaaagg	7500
acacaaggcc accagcccct cacttccta ccaggaccct ggccctctc tgggactgga	7560
gaaggacaaa gaggaccccc tctgtggagg tctacgacct ctctgacca agtagtccac	7620
tcaccacaag tggctctacc tctctgagtc tcagtttcca catccacaaa aggtggccaa	7680
tgctatctgc caccagaat ggctgtgagg gtggagcagg caaagcctct gtgccatcag	7740
agaaattgtg tctctttttc attttctccc agtgggtttc tttctcgtct ttattctttt	7800
tttttttttt ttttcctgtc tgttgtattt ttagggccgt gcctgtggca tacggaagtt	7860
cccagggtag gggccaatg ggagctgtag cccgggcct acgccacagc cacagcaatg	7920
tgggatctga gccacgtctg caacctacac cacagctcac ggcaacacca gatccttaac	7980
ccactgagca aggccaggga tcgagcccac gtcctcatgg atgctagtig ggttcgttaa	8040
ccgctgagcc atgatgataa ctctctttc tattcttttag tcacaaacag tcaacaaagg	8100
ttgctgacca aggctgatcg tgcccacccc ccagcccccc agactgggcc agtgcccacc	8160
ccttgggtct ctctggaaat cctgcccagc atcaattggc tccactctcc aggaggatgg	8220
gaagccctgt ggcccctggg actcacaccc ctctgcatct ccagagtgc aggacctggt	8280
cttcaggaga caccaagaac tggctcccc ggctctgctg ccccccaccc ctactaccag	8340
tttctctccc attctgccc agtccaggcc ccctgggggt actctcctct ctctgtacac	8400
cagtgaacc tcagaacctg ctccctcct gggaacaccc actaccacgt gggagaagg	8460
gtcgtctagg ggttgggccc cagatacact tgtaagcagg aacacacgag cccttacatg	8520
tgggtgtccc ggaagaagg ggttttccac ccccgcttt agtcaccctg ccctctgca	8580
gtgcctgag ccaccaagac ccagccaagg tctcctgcct tctggcctga gggccagctc	8640
cccatcctga aaaacctgtc tgggggcctc ccctgaggct gtagggcca aggcctcccc	8700

tgaggctgta gggcccaagg ggcaggttga acaggattcc cctctggccc ctcctacccc 8760
 caggacaaaa ccagagcccc aggacagggc ctcacttgcc tcaggaaacc acagcttgcc 8820
 agcaccacagc ccagcaccag cccagct 8847 <210>
 2 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> forward
 primer for amplifying porcin uroplakin II gene <400> 2 gatcctgatt ctgctggctb
 20 <210> 3 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 reverse primer for amplifying porcin uroplakin II gene <400> 3 atggtggtca
 tcacrgtgct 20 <210> 4 <211>
 3602 <212> DNA <213> Homo sapiens <300> <301> Lin, F. K. Suggs, S.
 Lin, C. H. Browne, J. K. Smalling, R. Egrie, J. C.
 Chen, K. K. Fox, G. M. Martin, F. Stabinsky, Z. <302>
 Cloning and expression of the human erythropoietin gene <303> Proc. Natl. Acad.
 Sci. U.S.A. <304> 82 <305> 22 <306> 7580-7584 <313> 1-3602 <400> 4
 aagcttctgg gcttccagac ccagctactt tgcggaactc agcaaccag gcatctctga 60
 gtctccgccc aagaccggga tgccccccag gggagggtgc cgggagccca gcctttccca 120
 gatagcacgc tccgccagtc ccaagggtgc gcaaccggct gcactcccct cccgcgaccc 180
 agggcccggg agcagccccc atgaccaca cgcacgtctg cagcagcccc gctcacgccc 240
 cggcgagcct caaccaggc gtccctgcccc tgctctgacc ccgggtggcc cctacccctg 300
 gcgaccctc acgcacacag cctctccccc acccccaccc gcgcacgcac acatgcagat 360
 aacagccccc acccccggcc agagccgcag agtccctggg ccaccccggc cgctcgctgc 420
 gctgcgccgc accgcgctgt cctcccggag ccggaccggg gccaccgcgc ccgctctgct 480

ccgacaccgc gccccctgga cagccgccct ctctcttagg cccgtggggc tggccctgca	540
ccgccgagct tcccgggatg agggcccccg gtgtgggtcac ccggcgcgcc ccaggtcgct	600
gagggacccc ggccaggcgc ggagatgggg gtgcacgggtg agtactcgcg ggctgggcgc	660
tcccgccgcc cgggtccctg tttgagcggg gatitagcgc cccggctatt ggccaggagg	720
tggctgggtt caaggaccgg cgacttgtca aggaccccgg aagggggagg ggggtggggc	780
agcctccacg tgccagcggg gacttggggg agtccttggg gatggcaaaa acctgacctg	840
tgaaggggac acagtttggg ggttgagggg aagaaggttt gggggttctg ctgtgccagt	900
ggagaggaag ctgataagct gataacctgg gcgctggagc caccattat ctgccagagg	960
ggaagcctct gtcacaccag gattgaagtt tggccggaga agtggatgct ggtagctggg	1020
ggtgggggtg gcacacggca gcaggattga atgaaggcca gggaggcagc acctgagtgc	1080
ttgcatggtt ggggacagga aggacgagct ggggcagaga cgtggggatg aaggaagctg	1140
tccttcaca gccacccttc tccctccccg cctgactctc agcctggcta tctgttctag	1200
aatgtcctgc ctggctgtgg cttctcctgt cctgctgtc gtcacctctg ggccctccag	1260
tcctgggcgc cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg	1320
aggccaagga ggccgagaat atcacggtga gacccttcc ccagcacatt ccacagaact	1380
cacgtcagg gcttcaggga actcctccca gatccaggaa cctggcactt ggtttgggg	1440
ggagttggga agctagacac tgcccccta cataagaata agtctgggtg ccccaaacca	1500
tacctggaaa ctaggcaagg agcaaagcca gcagatccta cggcctgtgg gccagggcc	1560
gagccttcag ggacccttga ctccccgggc tgtgtgcatt tcagacgggc tgtgtgaac	1620
actgcagctt gaatgagaat atcactgtcc cagacaccaa agttaatttc tatgcctgga	1680
agaggatgga ggtgagttcc tttttttttt tttttcctt cttttggaga atctcattt	1740

cgagcctgat tttggatgaa agggagaatg atcgggggaa aggtaaaatg gagcagcaga	1800
gatgaggctg cctgggcgca gaggctcacg tctataatcc caggctgaga tggccgagat	1860
gggagaattg cttgagccct ggagtttcag accaacctag gcagcatagt gagatcccc	1920
atctctacaa acatttaaaa aaattagtc ggtgaagtgg tgcattggtg tagtcccaga	1980
tatttgaag gctgaggcgg gaggatcgct tgagcccagg aatttgaggc tgcagtgagc	2040
tgtgatcaca ccactgcact ccagcctcag tgacagagtg aggcctgtc tcaaaaaaga	2100
aaagaaaaaa gaaaaataat gagggctgta tggaatacat tcattattca ttcactcact	2160
cactcactca ttcattcatt cattcattca acaagtctta ttgcatacct tctgtttgct	2220
cagcttggtg cttggggctg ctgaggggca ggaggagag ggtgacatgg gtcagctgac	2280
tcccagagtc cactccctgt aggtcgggca gcaggccgta gaagtctggc agggcctggc	2340
cctgctgtcg gaagctgtcc tgcggggcca ggccctgttg gtcaactctt cccagccgtg	2400
ggagccccctg cagctgcatg tggataaagc cgtcagtggc cttcgcagcc tcaccactct	2460
gcttcgggct ctgggagccc aggtgagtag gagcggacac ttctgcttgc cttttctgta	2520
agaaggggag aagggtcttg ctaaggagta caggaactgt ccgtattcct tccctttctg	2580
tggcactgca gcgacctcct gttttctcct tggcagaagg aagccatctc cctccagat	2640
gcggcctcag ctgctccact ccgaacaatc actgctgaca ctttccgcaa actcttccga	2700
gtctactcca atttctccg gggaaagctg aagctgtaca caggggaggc ctgcaggaca	2760
ggggacagat gaccaggtgt gtccacctgg gcatatccac cacctccctc accaacattg	2820
cttgtgccac accctcccc gccactcctg aacccgctg aggggctctc agctcagcgc	2880
cagcctgtcc catggacact ccagtgccag caatgacatc tcaggggcca gaggaactgt	2940
ccagagagca actctgagat ctaaggatgt cacagggcca acttgagggc ccagagcagg	3000

```

aagcattcag agagcagctt taaactcagg gacagagcca tgctgggaag acgcctgagc      3060
tcactcggca ccctgcaaaa ttgatgccca ggacacgctt tggaggcgat ttacctgttt      3120
tcgcacctac catcagggaac aggatgacct ggagaactta ggtggcaagc tgtgacttct      3180
ccaggtctca cgggcatggg cactcccttg gtggcaagag ccccttgac accggggtgg      3240
tgggaacat gaagacagga tgggggctgg cctctggctc tcatggggtc caagttttgt      3300
gtattcttca acctcattga caagaactga aaccaccaat atgactcttg gcttttctgt      3360
tttctgggaa cctccaaatc ccctggctct gtcccactcc tggcagcagt gcagcaggtc      3420
caggtccggg aaatgagggg tggagggggc tgggccctac gtgctgtctc acacagcctg      3480
tctgacctct cgacctaccg gcctaggcca caagctctgc ctacgtggt caataaggtg      3540
tctccattca aggcctcacc gcagtaaggc agctgccaac cctgcccagg gcaaggctgc      3600 ag
3602 <210>      5 <211>      1916 <212>      DNA <213>      Gallus gallus <220> <221>
misc_signal <222>      (1)..(1916) <223>      beta-globin insulator <400>      5 gcggccgcg
gcgtcaggtg gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaaccc ctatttgttt      60 atttttctaa
atacattcaa atatgtatcc gtcctatgaga caataaccct gataaatgct      120 tcaataatat
tgaaaaagga agagtcctga ggcggaagaa accagctgtg gaatgtgtgt      180 cagttagggt
gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat      240 ctcaattagt
cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg cagaagtatg      300 caaagcatgc
atctcaatta gtcagcaacc atagtccgc ccctaactcc gccatcccg      360 cccctaactc
cgcccagttc cgccattct cgcgccatg gctgactaat ttttttatt      420 tatgcagagg
ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt      480 tttggaggcc
taggcttttg caaagatcga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgc      540 gattgaacaa

```

gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	600 ctatgactgg
gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	660 gcaggggcg
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	720 agacaggca
gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct	780 cgacgttgc
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga	840 tctcctgtca
tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	900 gcggctgcat
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat	960 cgagcgagca
cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga	1020 gcatcagggg
ctcgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca tgcccgcagg	1080 cgaggatctc
gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg	1140 ccgcttttct
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat	1200 agcgttggct
accgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct	1260 cgtgctttac
ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga	1320 cgagttcttc
tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg	1380 ccatcacgag
atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt	1440 ttccgggacg
ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc	1500 caccctaggg
ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg aaccgcgct	1560 atgacggcaa
taaaaagaca gaataaaacg cagggtgttg ggtcgtttgt tcataaacgc	1620 ggggttcggt
cccagggtg gcactctgtc gataccccac cgagacccca ttggggccaa	1680 tacgcccgcg
tttcttcctt ttccccaccc cccccccaa gttcgggtga aggcccaggg	1740 ctgcagcca
acgtcggggc ggcaggccct gccatagcct caggttactc atatatactt	1800 tagattgatt

taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat 1860 aatctcatga
 ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc cgatcg 1916 <210> 6 <211>
 2254 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Cloning vector
 pEGFP-N1, complete sequence, enhanced green fluorescent protein (egfp) and
 neomycin phosphotransferase genes <400> 6 tcgactctag agggacagcc ccccccaaa
 gccccaggga atgtaattac gtccctcccc 60 cgctaggggc agcagcgagc cgcccggggc
 tccgctccgg tccggcgctc cccccgcatc 120 cccgagccgg cagcgtgcgg ggacagccccg
 ggacagggga aggtggcacg ggatcgcttt 180 cctctgaacg cttctcgctg ctctttgagc
 ctgcagacac ctgggggggat acggggaaaa 240 agcttttaggc tgaaagagag atttagaatg
 acagaatcat agaacggcct gggttgcaaa 300 ggagcacagt gctcatccag atccaacccc
 ctgctatgtg cagggtcatc aaccagcagc 360 ccaggctgcc cagagccaca tccagcctgg
 ccttgaatgc ctgcagggat ggggcatcca 420 cagcctcctt gggcaacctg ttcagtgcgt
 caccaccctc tgggggaaaa actgcctcct 480 catatccaac ccaaacctcc cctgtctcag
 tgtaaagcca ttcccccttg tcctatcaag 540 ggggagtttg ctgtgacatt gttgggtctgg
 ggtgacacat gtttgccaat tcagtgcac 600 acggagaggc agatcttggg gataaggaag
 tgcaggacag catggacgtg ggacatgcag 660 gtgttgaggg ctctgggaca ctctccaagt
 cacagcgttc agaacagcct taaggataag 720 aagataggat agaaggacaa agagcaagtt
 aaaaccagc atggagagga gcacaaaaag 780 gccacagaca ctgctgggtcc ctgtgtctga
 gcctgcatgt ttgatggtgt ctggatgcaa 840 gcagaagggg tggaagagct tgcctggaga
 gatacagctg ggtcagtagg actgggacag 900 gcagctggag aattgccatg tagatgttca
 tacaatcgtc aaatcatgaa ggctggaaag 960 cctccaagat cccaagacc aacccaacc

cacccaccgt gcccactggc catgtccctc
tccagggacg gtgaccccc cacctccgtg
ggagaaggta aatcttgcta aatccagccc
atctctcatc caactccagg acggagtcag
cccaaagcc ccaggggatg taattacgtc
ccggggctcc gctccggctc ggcgctcccc
cagcccgggc acggggaagg tggcacggga
tttgagcctg cagacacctg gggggatacg
tagaatgaca gaatcataga acggcctggg
caacccccctg ctatgtgcag ggtcatcaac
agcctggcct tgaatgcctg cagggatggg
agtgcgtcac caccctctgg gggaaaaact
gtctcagtgt aaagccattc ccccttgtcc
ggtctgggggt gacacatggt tgccaattca
aaggaagtgc aggacagcat ggacgtggga
tccaagtcac agcggttcaga acagccttaa
gcaagttaaa acccagcatg gagaggagca
tgtctgagcc tgcatgtttg atgggtgtctg
gtgccacatc cccacagttc ttcatcacct
gcagctgtgc cactgcagca ccgctctttg
accctcccct ggcacaacgt aaggccatta

1020 agtgccacat cccacagtt ctcatcacc
1080 ggcagctgtg ccactgcagc accgctcttt
1140 gaccctcccc tggcacaacg taaggccatt
1200 tgaggatggg gctctagagg gacagccccc
1260 cctccccgc taggggcagc agcgagccgc
1320 ccgcatcccc gagccggcag cgtgcgggga
1380 tcgctttcct ctgaacgctt ctcgctgctc
1440 gggaaaaagc tttaggctga aagagagatt
1500 ttgcaaagga gcacagtgtc catccagatc
1560 cagcagccca ggctgccag agccacatcc
1620 gcatccacag cctccttggg caacctgttc
1680 gcctcctcat atccaacca aacctccct
1740 tatcaagggg gagtttgctg tgacattgtt
1800 gtgcatcacg gagaggcaga tcttggggat
1860 catgcaggtg ttgagggtc tgggacactc
1920 ggataagaag ataggataga aggacaaaga
1980 caaaaaggcc acagacactg ctggtccctg
2040 gatgcaagca gaaggggtcc atgtccctca
2100 ccagggacgg tgaccccccc acctccgtgg
2160 gagaaggtaa atcttgctaa atccagcccg
2220 tctctcatcc aactccagga acggagtcag tgag

2254 <210> 7 <211> 632 <212> DNA <213> Woodchuck hepatitis B virus <220>

<221> misc_signal <222> (1)..(632) <223> woodchuck hepatitis virus

posttranscriptional regulatory element <400> 7 accaggttct gttcctgtta atcaacctct

ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg 60 tattcttaac tatgttgctc cttttacgct

atgtggatac gctgctttta tgcctttgta 120 tcatgctatt gcttcccgta tggctttcat

tttctcctcc ttgtataaat cctgggtgct 180 gtctctttat gaggagtgtt ggcccgttgt

caggcaacgt ggcgtggtgt gcaactgtgt 240 tgctgacgca acccccactg gttggggcat

tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac 300 tttcgctttc cccctcccta ttgccacggc

ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgtg 360 ctggacaggg gctcggtgtt tgggcactga

caattccgtg gtgttgtcgg ggaagctgac 420 gtcctttcca tggctgctcg cctgtgttgc

cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg 480 ctacgtccct tcggccctca atccagcgga

ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct 540 gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgccc

tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc 600 ctccccgcct gtttcgcctc gggctcctcg ag

632 <210> 8 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

forward primer for amplifying neomycin resistant gene <400> 8 gcggccgcgc

gcgtcaggtg gcac 24 <210> 9 <211>

29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for

amplifying neomycin resistant gene <400> 9 cgatcggacg ctacagtggaa cgaaaactc

29 <210> 10 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

forward primer for amplifying chicken B-globin insulator <400> 10 tcgactctag

agggacag 18 <210> 11 <211>

18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> reverse primer for
amplifying chicken B-globin insulator <400> 11 ctcactgact ccgttcct

18 <210> 12 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
forward primer for amplifying woodchuck hepatitis virus posttranscriptional
regulatory element <400> 12 accaggttct gttcctgtta atcaacctc

29 <210> 13 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
reverse primer for amplifying woodchuck hepatitis virus posttranscriptional
regulatory element <400> 13 ctcgaggagc ccgaggcgaa acaggcg

27